UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 807

GENÈSE, PURIFICATION ET STABILISATION DES STREPTOKINASES

Leur contrôle par le Thrombographe de Hirtz

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 21 mars 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

ELISABETH OCHSNER-GRÄSSLIN
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY. Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0010

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1960-1961 N° 807

GENÈSE, PURIFICATION ET STABILISATION DES STREPTOKINASES

Leur contrôle par le Thrombographe de Hirtz

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 21 mars 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

ELISABETH OCHSNER-GRÄSSLIN
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ✪, ✿
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

DOYEN HONORAIRE :

M. VOLMAR O. ✻, C. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ✪	Physique
	SARTORY, O. ✻, I. ✪, O. ✿	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ✪, ✿	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ✿	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ✻, ✻ I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ✻, ✪		Sciences naturelles
	MÉTAIS	(chargés des fonctions)	Sciences appliquées
	MALGRAS		Sciences naturelles
	LAUSTRIAT		Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :

M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

M.	MALGRAS		Bactériologie
Mme	KRISTENSEN		Chimie pharmaceutique
MM.	LAUSTRIAT		Chimie et Physique
	MATHIS		Chimie
	CARBIENER	(chargés des fonctions)	Histoire naturelle
	STAHL		Bactériologie et Parasitologie

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A MON MARI

INTRODUCTION

Poursuivant les travaux effectués dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* sur les différentes enzymes élaborées par les *Streptocoques hémolytiques*, le but de nos recherches était tout d'abord de contrôler la capacité d'élaborer des *Streptokinases* d'un certain nombre de souches de Streptocoques hémolytiques.

Nous avons ensuite examiné la stabilité des *Streptokinases* que nous avons pu isoler et essayé d'augmenter le rendement en Streptokinase à l'aide de milieux de culture spécialement sélectionnés et additionnés de différentes *Vitamines*.

Finalement, nous avons effectué un certain nombre de recherches pour isoler et purifier les *Streptokinases*.

La *Streptokinase* fait partie d'un groupe d'exotoxines qui sont produites par des *Streptocoques hémolytiques*, principalement du *groupe A de Lancefield*. La propriété essentielle de cette enzyme est son action lytique sur un coagulat de fibrine. La *Streptokinase*, tout comme les autres enzymes streptococciques : *Streptolysine*, *Hyaluronidase* et *Streptodornase*, ne présentait pendant fort longtemps qu'un intérêt théorique.

Aujourd'hui l'*emploi de Streptokinase combinée à la Streptodornase* est devenu courant, avec des résultats favorables, dans le traitement des exsudats séreux, purulents ou hémorragiques. Depuis fort longtemps on sait qu'un coagulat de fibrine peut se dissoudre spontanément dans le sérum. La refluidification du sang des cadavres, ainsi que la lyse accélérée des caillots sanguins à la suite d'opérations, dans les grossesses ou dans des états anaphylactiques ont été mentionnées vers la fin du siècle dernier. On ne pouvait cependant pas s'expliquer ce phénomène, surtout puisqu'on avait observé que des sérums traités par les produits les plus divers, tels que le *chloroforme*, *l'épinéphrine*, *l'éther*, *le thymol et l'acide trichloracétique* acquièrent tous des propriétés fibrinolytiques.

On croyait à l'intervention d'un ou de plusieurs facteurs de coagulation dans le phénomène de fibrinolyse, d'autant plus que la lyse se manifeste souvent spontanément après la coagulation complète. Certains auteurs incriminaient un *processus protéolytique* dû à un ferment contenu dans la fibrine précipitée. C'est seulement dans ces dernières années que des travaux sur les *enzymes microbiennes* ont apporté des données plus précises sur la fibrinolyse. Son mécanisme définitif n'est cependant toujours pas élucidé.

En 1933, GARNER et TILLET (1) ont découvert que l'*ultrafiltrat de cultures de certaines souches de Streptocoques possède la propriété de lyser rapidement la fibrine humaine.* Ils croyaient que le produit actif, la *Fibrinolysine*, diffusait dans le milieu ambiant et provenait du métabolisme bactérien. Pendant un certain temps, on rendait la *Fibrinolysine* responsable de l'action fibrinolytique comme unique facteur. MILSTONE (2) a montré ensuite que la fibrinolyse pouvait encore être produite par un autre facteur sérique qu'il a appelé « *lytic-factor* ». CHRISTENSEN (3) a prouvé la nature protéolytique de ce second facteur de la fibrinolyse et il le désigne sous le terme de « *sérum-protéase.* »

Ce n'est qu'en 1945 que CHRISTENSEN a constaté qu'il ne s'agissait pas de la *Fibrinolysine proprement dite*, et il a donné à l'enzyme streptococcique le nom de *Streptokinase*. Le rôle de celle-ci a été approfondi par GEIGER (4) en 1952 et cet auteur croit que l'activation de la Streptokinase nécessite la *sérum-protéase* (naturellement inactive) et un *cofacteur thermolabile du plasma*. Ce dernier semble être en rapport étroit avec le *complément* et GEIGER l'identifie au *chaînon* C'_1.

La *Streptokinase*, agissant sur ce proactivateur, transforme ensuite la *Profibrinolysine* en *Fibrinolysine* qui amène le processus de fibrinolyse.

Si ces travaux ont apporté quelques éclaircissements à ce problème, il reste cependant encore beaucoup de points obscurs qui méritent de retenir l'attention. C'est pour cette raison que nous avons jugé intéressant d'y apporter une contribution par notre travail.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, qu'il nous soit permis d'exprimer ici notre plus vive gratitude à Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* pour l'amabilité avec laquelle il nous a accueilli dans son laboratoire, pour l'intérêt qu'il a toujours porté à la marche de nos expériences et pour l'honneur qu'il nous fait en présidant notre jury.

Nous remercions également Monsieur Ch. LAPP, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, d'avoir bien voulu accepter de siéger dans ce jury.

Toute notre reconnaissance va à Monsieur J. MEYER, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*. Après nous avoir suggéré le sujet de notre travail, il nous a aidé de ses conseils avisés et de toute sa gentillesse à le mener à bien.

Nous n'oublions pas non plus l'amabilité que nous avons trouvée chez Monsieur J. MALGRAS, *Chargé de Cours à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* et auprès de toutes les personnes que nous avons connues dans ce *Service de Bactériologie*. Nous n'oublierons pas l'ambiance amicale qui y régnait et qui fait de notre séjour à l'Université de Strasbourg un des plus beaux souvenirs de notre vie d'étudiants.

PLAN DE TRAVAIL

Le problème qui nous a été posé concerne l'étude de la *production, de l'isolement, de la purification et de la caractérisation des Streptokinases élaborées par certains Streptocoques.*

La *Streptokinase* étant une kinase fibrinolytique nous donnons, dans la *première partie* de notre travail, les généralités sur les processus de coagulation et de fibrinolyse.

Dans le deuxième chapitre nous insistons sur l'origine, la préparation et les propriétés de la *Streptokinase.* Nous apportons également quelques données sur l'emploi thérapeutique de la combinaison *Streptokinase-Streptodornase* et mentionnons succinctement les *Antistreptokinases.*

Nos travaux personnels font l'objet de quatre chapitres, *dont le premier* a trait à l'élaboration d'une méthode de dosage de la *Streptokinase au moyen du Thrombographe de* HIRTZ.

Dans le chapitre suivant nous déterminons la production de *Streptokinase de différentes souches de Streptocoques.* Nous la dosons dans les filtrats de culture de cinq *Streptocoques* sélectionnés et contrôlons ensuite sa stabilité vis-à-vis de facteurs physiques et chimiques.

L'influence des *diverses Vitamines et d'autres activateurs* sur la production de *Streptokinase* est étudiée dans un chapitre spécial. Ce fait nous a semblé important pour augmenter le *taux de Streptokinase* dans les cultures.

Finalement, nous expliquons, dans le *chapitre VI*, les méthodes d'isolement et de purification des *Streptokinases* et nous aurons l'occasion de sélectionner la méthode qui nous donne le meilleur rendement avec des moyens relativement simples.

Des *conclusions générales* terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LA COAGULATION ET LA FIBRINOLYSE

Pour rendre le processus de *fibrinolyse* compréhensible, il nous faut tout d'abord expliquer le *mécanisme de la coagulation du sang*. En 1832 déjà, J. Muller a découvert le *Fibrinogène* et en 1872 Alexander Schmidt la *Prothrombine*, de sorte que le *Fibrinogène* est désigné comme « *facteur I* » et la *Prothrombine* comme « *facteur II* ». Chronologiquement, on a désigné alors la *Thrombokinase* comme « *facteur III* » du système de coagulation. En 1890, Arthus et Paget (5) ont mis en évidence comme *facteur IV* le *Calcium*, dont le rôle physiologique dans la coagulation a été démontré par Hammersten.

Morawitz a constaté en 1895 que la *Thrombine* est formée dans la première phase de la coagulation à partir d'un proactivateur inactif, la *Prothrombine*, en association avec la *Thrombokinase* et le *Calcium* et il a démontré que la *Thrombine* ainsi formée intervient au cours de la deuxième phase du système de coagulation pour transformer le *Fibrinogène* dissout en *Fibrine* solide. Ces constatations constituent la base de la théorie classique actuelle du processus de coagulation.

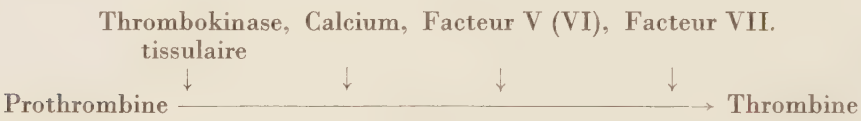
En considérant la théorie de Morawitz (6), Quick (7) a établi en 1935 le principe de sa méthode de détermination de la *Prothrombine; il s'agit d'une méthode monophasée* c'est-à-dire que les première et seconde phases de la coagulation évoluent simultanément. Son principe consiste en la détermination de la *Prothrombine* en maintenant constants les trois autres facteurs : *Thrombokinase, Calcium et Fibrinogène*. Ce fait est réalisé pour le Calcium au moyen de la recalcification du plasma oxalaté par une solution de Chlorure de calcium N/40. Le taux de *Fibrinogène* peut être négligé, puisqu'il n'influence que très peu le processus de coagulation. La constance de la *Thrombokinase* est garantie, d'après la conception de Quick, en introduisant dans le substrat réactionnel un excès de Thrombokinase sous forme d'une *suspension de poudre de cervelle*.

Owren (8), en contrôlant le *temps de Prothrombine* d'un malade par *la méthode de* Quick *monophasée*, l'a trouvé prolongé alors que la méthode biphasée a donné une valeur normale. Il en a déduit que dans ce cas, *ce n'était pas la Prothrombine qui manquait, mais un facteur jusqu'alors inconnu qu'il a désigné comme « facteur V »*.

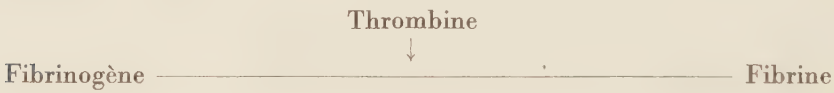
Les recherches d'Alexander (9), Koller (10) et Owren ont montré que la *Prothrombine* en excès pouvait être fractionnée en deux facteurs. Koller, un élève d'Arthus, a élucidé avec ses collaborateurs Lœliger et Duckert (11) la fonction de ces deux composants. D'après ces auteurs, la *formation de la Thrombine dépend du taux de Prothrombine*. La *vitesse de formation de la Thrombine* dépend du deuxième composant que Koller a désigné comme « *facteur VII* », ceci puisque Owren avait déjà réservé la dénomination de « *facteur VI* » à un hypothétique produit catalysant le facteur V.

D'après Koller *et son école*, le processus physiologique de la coagulation avait ainsi atteint son terme, du moins pour autant qu'on puisse le contrôler par la *méthode monophasée* de Quick. On peut schématiser la conception de Koller de la façon suivante :

PREMIÈRE PHASE :



DEUXIÈME PHASE :



Par la suite Jurgens et *ses élèves* (12) ont modifié le *schéma de coagulation de* Morawitz en y ajoutant différents accélérateurs et inhibiteurs. Finalement, ce sont Marbet et Winterstein (13) qui ont établi un schéma du processus de coagulation qui peut être considéré comme englobant la totalité des facteurs jusqu'à présent connus. Nous renvoyons à ce sujet au travail d'Ostrom (14).

Ainsi, les facteurs intervenant dans le phénomène de coagulation sont passés de quatre à dix, que nous énumérons ci-dessous :

En plus des quatre facteurs connus depuis fort longtemps déjà, on a isolé :

Le facteur V = Proaccélérine
le facteur VI = Accélérine
le facteur VII = Proconvertine
le facteur VIII = Prothrombinase

le facteur IX = Thromboplastine plasmatique ou « *Christmas-factor* »
le facteur X = Antithrombine.

D'après Marbet et Winterstein, la coagulation sanguine s'effectue ainsi en quatre phases essentielles, dans lesquelles interviennent un certain nombre de facteurs d'origine plaquettaire, alors que d'autres sont d'origine plasmatique.

Si l'on considère à côté de ces facteurs physiologiques, l'intervention possible d'un grand nombre d'éléments pathologiques dans ce processus de coagulation, on entrevoit la complexité de ce problème et la difficulté qu'il y aurait à capter l'ensemble des facteurs intervenant dans cette réaction. On peut cependant dissocier *deux temps essentiels* au cours de la coagulation :

1) *la formation de la Thrombine,*
2) *la conversion du Fibrinogène en Fibrine.*

Au point de vue pathologie, la *coagulation intervient dans le mécanisme de l'hémostase.* Un défaut de coagulation peut entraîner des troubles de l'hémostase. Dans certains cas, le défaut de coagulation se manifeste par un allongement du temps de coagulation; un retard important ne se voit pratiquement que dans l'hémophilie ou en présence d'un anticoagulant circulant, type *Héparine* par exemple. Il existe cependant d'autres défauts de la coagulation avec un temps de coagulation sensiblement normal. Quick a déjà souligné *que ce qui compte pour l'hémostase n'est pas le temps de coagulation, mais la quantité de Thrombine formée ;* cependant il est bien démontré à l'heure actuelle que le temps de coagulation est dans une très large mesure indépendant de cette quantité. *Pratiquement, le temps de coagulation dépend de la vitesse de conversion de la Prothrombine et non pas de son taux. Cette vitesse est à son tour fonction de la quantité de Thromboplastine présente.* Ainsi, en ajoutant de la Thromboplastine sous forme d'un extrait aqueux de tissus, on raccourcit le temps de coagulation de plusieurs minutes à 12 secondes. Il suffit qu'une faible fraction de la *Prothrombine* soit rapidement convertie en *Thrombine*, pour que le sang coagule dans les délais normaux. D'autres épreuves sont donc utilisées à l'heure actuelle pour constater ces troubles des diathèses hémorragiques : l'évaluation quantitative de la prothrombinémie et la consommation de Prothrombine, c'*est-à-dire l'évaluation de la quantité de Prothrombine utilisée au cours de la coagulation.* La consommation de Prothrombine dépend de la quantité de Thromboplastine disponible.

Pour ces différentes méthodes, employées en clinique, nous renvoyons à Feissly (15).

Une hémostase déficiente peut en principe résulter soit d'une *hypoprothrombinémie* (c'est le cas dans l'*Avitaminose K*) soit d'une *consommation insuffisante de Prothrombine*, ce qui est le cas dans l'hémophilie. Celle-ci est en effet caractérisée par un défaut de Thromboplastine, d'où absence

d'activation de la Prothrombine. Nous aurons l'occasion, au cours de notre travail, de démontrer que d'autres facteurs, tels que la *Streptokinase*, peuvent intervenir pour inhiber l'action de la Prothrombine. Ainsi, les syndromes hémorragiques par défaut de coagulation peuvent être dus à l'absence du *Fibrinogène*, de la *Prothrombine* ou d'un *activateur de la Prothrombine*, mais ils peuvent être imputables aussi à l'existence d'un *anticoagulant circulant, tel que la Streptokinase*, pouvant exister dans des infections streptococciques aiguës ou latentes.

La fibrinolyse :

Si l'on conserve aseptiquement le caillot sanguin dans son propre sérum, il demeure intact pendant quelques jours. Dans certains cas, on constate cependant une dissolution totale ou partielle. Il s'agit du phénomène appelé *fibrinolyse* par Dastre (16).

La fibrinolyse n'est une dissolution simple. On se trouve en effet en présence d'un processus irréversible et l'adjonction de *Thrombine* à la *Fibrine* lysée ne s'accompagne pas d'une nouvelle coagulation. *La dissolution aseptique du caillot résulte de la digestion de la Fibrine par une enzyme sérique.* En effet, le plasma renferme à l'état normal une *protéase* inactive qui se trouve dans la fraction des *globulines* (fraction III_3 de Cohn) et qui peut être activée soit « *in vivo* » dans certaines conditions physiologiques, soit « *in vitro* » sous l'influence de divers agents.

La *Streptokinase* étant un facteur essentiel de la fibrinolyse, nous jugeons nécessaire de donner quelques détails sur celle-ci. Disons d'abord quelques mots sur la terminologie utilisée par les divers auteurs.

Christensen et Mac Lean (17) distinguent le *Plasminogène*, qui est l'enzyme protéolytique inactive du plasma, la *Streptokinase* qui est le facteur activant sécrété par le Streptocoque, et la *Plasmine* qui est le Plasminogène activé par la Streptokinase. Ferguson (18) désigne ces trois facteurs par les termes de *Tryptogène*, *Tryptokinase et Tryptase*. Loomis, Ryder et George (19) proposent les termes de *Profibrinolysine*, *Streptokinase et Fibrinolysine*. Ce sont ces noms que nous utiliserons dans l'exposé de notre travail.

Les termes *Plasminogène*, *Tryptogène*, *Profibrinolysine* s'appliquent ainsi au précurseur plasmatique de la *Protéase*, nom donné par Burstein (20) à la *Fibrinolysine*. Les termes *Plasmine*, *Tryptase*, *Protéase* correspondent donc à la *Fibrinolysine activée*. Les termes *Streptokinase*, *Tryptokinase* sont identiques à la *Fibrinolysine streptococcique*. Astrup et Permin (21) ont proposé en outre d'appeler *Fibrinokinase* le facteur qu'ils ont isolé à partir des tissus animaux et qui se comporte comme la *Streptokinase* transformant la Profibrinolysine inactive en Fibrinolysine active.

Il existe d'une part une analogie très poussée entre l'activation *de la Profibrinolysine par la Streptokinase* et l'activation du *Trypsinogène pancréatique par l'Entérokinase*. La *Profibrinolysine* serait l'équivalent du *Trypsinogène*, la *Fibrinolysine* celui de la *Trypsine* et la *Streptokinase* celui de l'*Entérokinase*.

D'autre part, en se basant sur *la réaction de déviation du complément* en présence d'hémolysines et d'hématies de mouton, Geiger croit pouvoir rapprocher *la réaction de Streptokinase* du système fibrinolytique sanguin de la *réaction d'hémolyse*. La *Streptokinase* nécessite deux facteurs pour activer la *Profibrinolysine:* un facteur thermostable, toujours présent dans le sérum humain chauffé, dans le lait de femme et de vache et dans la salive humaine; puis un facteur thermolabile qui a été décelé dans le sérum de cobaye, de lapin et de canard. *Ce dernier facteur semble avoir une certaine analogie avec le chaînon central du complément.*

On aurait ainsi le facteur thermostable comparable à l'*hémolysine*, et le facteur thermolabile comparable au *complément*. D'après Geiger, la *Streptokinase* se fixerait en premier lieu sur le facteur thermostable; le complexe ainsi formé permettrait au facteur thermolabile d'agir comme activateur de la *Profibrinolysine*.

Cette dernière théorie nous paraît plus justifiée que celle d'Astrup et Permin. En effet, le *Trypsinogène et la Profibrinolysine* ont chacun leur activateur spécifique, l'*Entérokinase* dans un cas, la *Streptokinase* dans l'autre. L'*Entérokinase* n'active pas la *Profibrinolysine* et la *Streptokinase* n'active pas le *Trypsinogène*. Par ailleurs, la *Fibrinolysine* existe, d'après Tagnon (22), chez les animaux dépancréatisés.

Au point de vue chimique, la *Fibrinolysine* appartient à la fraction des *globulines sériques*.

Pour réaliser la fibrinolyse, le proferment inactif *Profibrinolysine* est transformé en ferment actif *Fibrinolysine* par l'intervention de différentes *Fibrinolysokinases*, dont on connaît : une kinase sérique, une kinase tissulaire et des kinases bactériennes. Comme il ressort du schéma que nous donnons plus loin, les *Fibrinokinases* sérique et tissulaire peuvent transformer directement la *Profibrinolysine en Fibrinolysine*. Les diverses kinases bactériennes : *Streptokinase*, *Staphylokinase*, etc., ont besoin d'un cofacteur sérique thermolabile.

Kline et Fishman (23) ont réfuté cette opinion dans leurs récents travaux, et estiment que les kinases bactériennes agissent directement sur la *Profibrinolysine*, du moins dans le sérum humain. Notre schéma donne un aperçu général, pouvant expliquer la conception actuelle du rôle de la *Streptokinase* dans le processus de fibrinolyse (p. 25).

Il existe dans le plasma différents inhibiteurs qui sont liés aux albumines, d'après Grob (24); un de ces inhibiteurs a été désigné par les termes d'*Antitryptase*, *d'Antiplasmine* ou *d'Antifibrinolysine;* il détruit la *Fibrinolysine*, mais non la *Profibrinolysine*. On peut également trouver dans le sang un facteur qui neutralise l'exotoxine streptococcique : c'est l'*Antistreptokinase*, appelée autrefois *Antifibrinolysine streptococcique*. Il s'agit ici d'un anticorps qui apparaît dans les humeurs des sujets atteints d'une affection streptococcique.

On se rend ainsi compte que le mécanisme enzymatique d'activation et d'inhibition du processus général de fibrinolyse est sensiblement comparable au système de coagulation sanguine.

L'importance clinique de la fibrinolyse réside dans le fait qu'elle touche toute une série de problèmes intéressants, qui ne sont pas encore résolus actuellement. Von Kaulla (25), ainsi que Halse (26) se sont principalement occupés de cette question. L'emploi clinique de la *Fibrinolysine et de ses proactivateurs* n'a été utilisé jusqu'à présent que pour l'activation locale de la fibrinolyse dans les hémothorax, empyèmes, épanchements articulaires, etc. La grande importance de l'activation de la fibrinolyse pour la reconstitution des vaisseaux thrombosés, la fluidification de thrombus emboliques ou cardiaques, est facilement compréhensible, mais elle n'a donné que des résultats peu satisfaisants jusqu'à présent. La raison en est que les différentes kinases actives ne permettent pas des injections suffisantes dans la circulation sanguine, par suite de leur toxicité. On a pu cependant activer le potentiel fibrinolytique par une pyrétothérapie, par exemple au moyen de *Pyréxal*, mais l'activation est de courte durée.

L'emploi thérapeutique de ces différents facteurs intervenant dans le processus de fibrinolyse pourrait devenir intéressant dans les diverses diathèses hémorragiques qui sont dues à une activation directe ou indirecte de la fibrinolyse. Celle-ci a pour rôle essentiel la dissolution de caillots de fibrine qui se forment localement au cours de réactions inflammatoires. Dans la phase résolutive de la pneumonie, il y a lyse d'une quantité importante de fibrine. La perméabilité des vaisseaux thrombosés est également due à la fibrinolyse. Il s'agit ici toujours de réactions purement physiologiques. Le sang menstruel, qui paraît incoagulable est en réalité un sang qui a coagulé et subi une fibrinolyse rapide et totale au niveau de l'endomètre.

On voit ainsi que la *fibrinolyse intervient physiologiquement au cours de la menstruation normale*. Cependant, dans ce cas, il est fort probable qu'elle dépende non seulement de la *Fibrinolysine*, mais aussi *des enzymes protéolytiques tissulaires*. D'après Nolf (27), il serait inexact de dire que le sang reste toujours parfaitement fluide à l'intérieur des vaisseaux. Il admet qu'il se produit normalement dans le sang circulant une coagulation limitée au dépôt d'une mince couche de fibrine sur l'endothélium vasculaire ; cette fibrine serait aussitôt dégradée par fibrinolyse. On ignore à l'heure actuelle quel est l'activateur physiologique « *in vivo* » de la *Fibrinolysine* et quels sont ses mécanismes régulateurs. Halse envisage l'intervention du système nerveux central.

En terminant ce chapitre, nous renvoyons au travail de Frey (28) pour ce qui concerne les autres activateurs et inhibiteurs de la fibrinolyse.

Pour mesurer l'activité fibrinolytique, il existe un très grand nombre de méthodes, mais en clinique on a le plus souvent recours à celle de Seegers et Johnson (29). On introduit dans un tube à essai une dose

exactement mesurée d'une solution standardisée de *Fibrinogène* que l'on fait coaguler au moyen d'une solution standardisée de *Thrombine*. La formation du gel fibrineux doit s'effectuer au cours des premières 40 secondes. A ce moment, on introduit le réactif fibrinolytique et l'on mesure le temps nécessaire à la dissolution complète du gel, correspondant à la lyse complète. Une unité fibrinolytique correspond à l'activité occasionnant la lyse de 1 cc d'un coagulat de fibrine obtenu avec une solution de 0,1% de *Fibrinogène* et ceci à 28° et en 120 secondes.

CHAPITRE II

GÉNÉRALITÉS SUR LA STREPTOKINASE

Dans le cadre de notre travail nous jugeons indispensable de rappeler les généralités sur la *Streptokinase*, que nous empruntons en grande partie à FREY.

Origine et propriétés :

Les *Streptokinases* sont principalement élaborées par des *Streptocoques hémolytiques du groupe A de Lancefield*. D'après la plupart des auteurs, 95 % des sources de *Streptocoques β-hémolytiques pathogènes pour l'homme* sont capables de former des *Streptokinases*. On trouve également dans le *groupe C* des espèces à activité fibrinolytique qui sont, dans certains cas, au moins équivalentes à celles du *groupe A*. Chez les autres *Streptocoques non-hémolytiques*, chez les *Pneumocoques* et les *Entérocoques*, on n'a pu déceler qu'exceptionnellement la formation de *Streptokinase* et ceci uniquement en les cultivant dans des conditions spécialement adaptées.

D'après les recherches de FLETCHER et JOHNSON (30) la *Streptokinase* a un poids moléculaire de 50 000 environ, déterminé par la méthode d'ultra-centrifugation. Ces auteurs ont également pu prouver sa constitution protéinique. Son point iso-électrique se situe entre pH = 4,7 et 5,0. L'optimum d'action de la *Streptokinase* se trouve entre pH = 7,3 et 7,6 ; elle est assez résistante vis-à-vis de la concentration en ions H et n'est détruite que par de grandes variations de celle-ci.

Essai de standardisation de la Streptokinase :

D'après la méthode de CHRISTENSEN, on introduit dans une série de tubes à essai un système standard de coagulation et des doses progressivement décroissantes d'une solution donnée de *Streptokinase*. On porte au bain-marie à 35° et on note le temps de lyse dans les différents tubes.

Par définition, la dilution qui dissout le substrat standard coagulé en 10 minutes et à 35° contient *une unité* de Streptokinase.

Les réactifs nécessaires pour ce dosage sont les suivants :

STREPTOKINASE : 0,1 cc d'une dilution en tampon boraté.

FIBRINOGÈNE : 0,4 cc de Fibrinogène de bœuf (*fraction I Armor*) en solution tampon boratée à 0,25 %.

PROFIBRINOLYSINE : 0,5 cc de la *fraction Harward III* d'un plasma humain en solution tampon boratée à 0,25 %.

THROMBINE : 0,1 cc d'« *Hemostatic globulin Lederle* » diluée à 1 3 dans la solution tampon boratée.

Préparation de la Streptokinase :

D'après CHRISTENSEN (31) on emploie de préférence des *Streptocoques du groupe C de Lancefield* et en particulier la *souche* H 46 A qui, tout en étant un bon producteur de *Streptokinase*, n'est pas pathogène pour l'homme, ce qui permet d'éviter des réactions secondaires toxiniques lors de son emploi thérapeutique.

CHRISTENSEN a eu recours à un milieu spécial, nettement défini, à base de peptone et de glucose, stérilisé par ultrafiltration. A cet ultrafiltrat, il ajoute les facteurs de croissance suivants :

Uracile	150,0 mg
Sulfate d'Adénine	150,0 mg
Acide nicotinique	15,0 mg
Biotine	15,0 γ
Pyridoxine	22,0 mg
Tryptophane	300,0 mg
Pantothénate de calcium	75,0 mg
Thiamine	37,0 mg
Riboflavine	7,5 mg
Glutamine	750,0 mg
Solution d'oligo-éléments	30,0 cc
Eau distillée q.s.p.	150,0 cc

Le milieu ainsi préparé est ensemencé et disposé à 37°. Le taux relativement bas de glucose (1 %) permet d'amorcer pendant les premières 12 heures la culture dans un ballon muni d'un agitateur mécanique. Dans ces conditions, la production d'acides est très faible. A ce moment, on augmente le taux de glucose à environ 5 %, en neutralisant alors successivement les acides libérés par le développement bactérien au moyen de NaOH. Cette manipulation doit être effectuée toutes les 15 à 25 minutes, puisque la production d'acide lactique est très importante. *Au moment où le pH reste stable*, c'est-à-dire après 8 heures environ, *le maximum de la production de Streptokinase est atteint* et pour éviter sa destruction par le lactate de sodium, inhibiteur très prononcé, on interrompt le développement microbien.

Isolement de la Streptokinase :

On peut employer la méthode de CHRISTENSEN : on élimine la masse bactérienne par centrifugation au moyen d'un *centrifugeur* SHARPLES à 40 000 t mn; on décante le centrifugat et on l'amène à un pH de 3,8 à 4,2 au moyen d'*acide chlorhydrique dilué* ou d'*acide acétique concentré*. On précipite la *Streptokinase* et en même temps la *Streptodornase* par l'alcool refroidi à — 8°, pour obtenir une concentration finale d'environ 40 % d'enzyme. On sépare le précipité blanc floconneux par centrifugation à 3 000 t/mn; le culot ainsi obtenu est dissous dans le tampon boraté ajusté à pH — 7,8. On obtient un produit brut contenant, en plus de *Streptokinase* et de *Streptodornase*, des bactéries et différents produits protéiniques et nucléiques d'origine bactérienne.

Purification de la Streptokinase :

Différentes techniques ont été décrites à ce sujet, mais nous donnons ci-dessous la description des méthodes de CHRISTENSEN et de FLETCHER et JOHNSON.

Technique de Christensen:

On prépare une solution d'environ 3 % de *Streptokinase brute* dans le tampon boraté de pH 7,8. On centrifuge à froid pour éliminer les particules insolubles. Le liquide surnageant limpide est décanté et on le ramène au moyen d'eau à un taux d'azote d'environ 0,4 mg/cc. Puis on ajuste cette solution à un pH de 5,6 au moyen du *tampon d'acétate de* PILLEMER. On ajoute une solution à 1 % de *Protamine* dans les proportions de 1 cc pour 10 mg d'azote. On centrifuge entre 4 000 et 5 000 t/mn et on élimine ainsi les protéines étrangères à l'enzyme. On prélève un petit échantillon du centrifugat pour vérifier qu'une nouvelle addition de *Protamine* n'amène plus de précipitation. Le liquide limpide est refroidi à 0° et additionné d'alcool également refroidi à — 10° jusqu'à un taux final de 10 %. On laisse reposer à — 8° ou — 10° pendant 12 heures; il se forme un précipité blanc floconneux que l'on sépare par centrifugation à froid; on décante et le culot est dissous dans la solution tampon boratée de pH 7,8. La plus grande partie entre en solution et l'on sépare encore les traces de produit insoluble par centrifugation. Le centrifugat ainsi obtenu contient les deux enzymes *Streptokinase* et *Streptodornase* et présente une activité kinasique d'environ 25 % de celle du *produit enzymatique brut*. La *Streptodornase* peut être séparée par un nouveau traitement à l'alcool refroidi, ajouté au taux de 20 %. En ajustant cette solution alcoolique à pH = 5,6, la *Streptokinase pure est précipitée et la Streptodornase reste en solution*.

Techniques de Fletcher et Johnson :

PREMIÈRE MÉTHODE :

On prépare une solution d'environ 2 à 5 % de *Streptokinase brute* dans un solvant aqueux à 0,25 mol. de *sel disodique de l'acide diéthylène-diamine-tétra-acétique*. Ce produit est connu dans le commerce sous le nom de « *Complexon III* ». La solution ainsi préparée est filtrée à travers un filtre en verre fritté et le filtrat est additionné d'un excès d'éther refroidi. Le mélange est rapidement congelé dans un réactif alcool-glace; après deux heures, on dégèle avec précaution et on peut séparer une couche lipidique surnageante. La phase aqueuse limpide est ajustée à un pH de 5,3 par un tampon d'acétate, on précipite la *Streptokinase* au moyen d'alcool refroidi, ajouté au taux final de 12,5 %. D'après les auteurs, l'activité du produit ainsi préparé est encore de 40 % de celle de la *Streptokinase brute;* ils ont dosé 150 à 220 unités pour un prélèvement contenant 1 γ d'azote.

DEUXIÈME MÉTHODE :

On dissout 10 g de *Streptokinase brute* dans 100 cc de la solution de *sel disodique de l'acide diéthylène-diamine-tétra-acétique* à 0,5 mol. introduits dans 1 600 cc d'une solution de *phosphate disodique* à 0,02 mol. On ajuste le pH à 9,0 au moyen de NaOH N/10, on agite soigneusement pour dissoudre le maximum du produit brut, on ramène précautionneusement le pH à 8,0 au moyen d'une solution de HCl N/10. On introduit alors 40 g de *cellite lavée* et on agite pendant 30 minutes. On élimine la cellite et les impuretés adsorbées par filtration, le filtrat est additionné de 400 g d'une suspension de *phosphate tricalcique*, puis on agite pendant une heure. On sépare par centrifugation le gel qui s'est formé et le filtrat limpide refroidi est traité avec une *solution saturée de sulfate d'ammonium* pour obtenir une concentration finale de 30 % de ce sel.

On laisse reposer pendant trois heures et on filtre à travers un filtre en verre fritté, muni de 10 g de *cellite*. On rejette le précipité, le filtrat est encore traité avec une solution de *sulfate d'ammonium* au taux final de 42 %. On laisse reposer pendant 12 heures, on centrifuge et le culot est repris dans une solution tampon boratée de pH 8,0. A ce moment, le rendement correspond à environ 50 % de l'activité initiale, et une solution de 1 γ d'azote correspond à 300 unités de *Streptokinase*.

La solution filtrée est refroidie à 0°; on ajoute à deux parties de filtrat, une partie d'éther refroidi à — 5° en mélangeant soigneusement. Cette manipulation doit être très lente et s'étendre sur trois heures; en même temps, il faut veiller à ce que la température se maintienne à — 5°. On centrifuge toujours à froid; le liquide aqueux décanté est encore traité avec l'éther (1 partie d'éther pour 4 parties de filtrat) puis on l'introduit dans 500 cc d'eau saturée d'éther et contenant 4 cc d'une solution d'*acétate de sodium* à 0,2 mol. On ramène le pH à 6,2 au moyen d'*acide acétique* et l'on ajoute de l'*acétate de zinc* pour obtenir

une concentration finale en zinc de 0,01 mol. On laisse reposer pendant au moins 12 heures, on centrifuge pour recueillir le précipité formé par la *Streptokinase purifiée* avec un rendement de 15 % et sa solution contenant 1 γ d'azote, doit contenir 370 à 430 unités de Streptokinase.

La Streptodornase :

Au cours d'expériences thérapeutiques au moyen de la *Streptokinase*, on avait noté que ces préparations streptococciques plus ou moins purifiées occasionnaient également la dissolution d'exsudats purulents. On a ainsi pu mettre en évidence la *Streptodornase*, une désoxyribonucléase, qui dépolimérise les désoxyribonucléoprotéines et l'acide désoxyribonucléique. La *Streptodornase* semble être un complexe enzymatique qui dégrade la molécule protéinique élevée jusqu'aux bases puriques et pyrimidiques. Elle est thermolabile et sensible à l'agitation. Son activité est freinée par la présence de *sulfate de soude* ou d'*héparine*. Elle est par contre stimulée par les *ions de manganèse et de magnésium*. Son optimum d'action se trouve entre pH = 7,0 et 8,5.

L'activité de la *Streptodornase* a également été standardisée : l'unité de *Streptadornase* correspond à la dose minimale d'enzyme qui diminue d'une *poise* la viscosité de 2,4 cc d'une solution donnée d'acide désoxyribonucléique d'origine thymique, et ceci en 10 minutes et à 30°.

Cette mesure est effectuée au *viscosimètre d'*Ostwald d'après les données de Mac Carty (32).

Emploi thérapeutique de la combinaison Streptokinase-Streptodornase :

Comme nous l'avons déjà indiqué, la *Streptokinase* active la Profibrinolysine pour la transformer en Fibrinolysine. Elle peut par conséquent être employée pour fluidifier le sang coagulé et des exsudats fibrineux, *à condition qu'il y ait suffisamment d'euglobulines plasmatiques indispensables à cette activation*. Dans les cas où ce taux d'euglobulines est déficient, il faut associer la préparation enzymatique avec une certaine dose de plasma humain.

La Streptodornase décompose les déchets cellulaires du pus et fluidifie des exsudats visqueux. L'emploi de cette enzyme fait disparaître les éléments cellulaires dégénérés. Comme on le sait, les leucocytes ne peuvent agir comme phagocytes qu'à l'état amiboïde; la *Streptodornase*, qui évite l'agglomération et l'agglutination des leucocytes par la dégradation des dérivés de l'acide désoxyribonucléique, *stimule ainsi la phagocytose*. L'association *Streptodornase-Streptokinase* n'a aucun effet sur les cellules vivantes.

En résumé, nous pouvons dire que ces préparations enzymatiques ont le rôle suivant :

— *Destruction des éléments nucléaires provenant de cellules dégénérées.*

— *Elimination de dérivés désoxyribonucléiques extracellulaires.*
— *Dissolution d'exsudats purulents visqueux ou fibrineux.*
— *Fluidification des caillots sanguins.*
— *Stimulation de la phagocytose.*

Ces enzymes ne posséderaient pas d'action sur le tissu conjonctif, les mucoprotéides et le collagène; les fibres et les tendons ne sont pas attaqués non plus.

Au point de vue clinique, l'accumulation de leucocytes, de macrophages et de fibrine au niveau d'une plaie indique que l'organisme lésé essaie de se défendre contre le traumatisme, qu'il soit d'origine microbienne, chimique ou physique. *Les déchets de ces éléments de défense peuvent cependant ralentir le processus régénératif*, en empêchant l'afflux de phagocytes nouveaux ou des médicaments antimicrobiens et anti-inflammatoires vers la plaie. D'autres part, *les mailles de fibrine formées peuvent capter des bactéries qui sont ainsi protégées contre les éléments naturels ou thérapeutiques de défense.* Il incombe par conséquent au médecin de faciliter l'écoulement de la sécrétion en éliminant le pus et les caillots sanguins. Autrefois, on était obligé de recourir à une intervention chirurgicale pour éliminer la fibrine et les nucléoprotéides, à moins qu'on ne se fiait simplement aux processus de défense naturelle, ce qui n'était pas sans danger.

Des travaux effectués dans les « *Lederle Laboratories* » ont montré que l'application intramusculaire de l'association Streptokinase-Streptodornase (*Varidase*) a un effet très favorable sur les processus inflammatoires. On a pu montrer que les exsudats inflammatoires et les liquides œdémateux contiennent une forte proportion de fibrine. Celle-ci semble constituer un mécanisme de défense naturelle, essayant de délimiter la lésion et d'éviter l'extension de l'infection. D'autre part, à la suite de l'emploi thérapeutique des antibiotiques, on a pu constater que ces substances antimicrobiennes ne pouvaient pénétrer à l'intérieur de lésions, d'abcès ou de phlegmons, qui se trouvaient protégés par cette gaine de fibrine. *On a par conséquent tenté de faciliter l'adduction des antibiotiques et des autres médicaments anti-infectieux par l'emploi de la Streptokinase.*

Au début, cela n'était possible que dans des lésions superficielles: les travaux des chercheurs américains ont alors prouvé que l'*injection intramusculaire de Varidase* occasionnait une dissolution de la membrane de fibrine sans phénomènes nuisibles, avec de très bons résultats dans les cas d'abcès et de phlegmons.

Dans les affections cutanées, telles qu'infections purulentes, nécroses d'irradiation ou traumatiques, la *Varidase* sous forme de *gel* ou de *compresses humides* a donné également de très bons résultats.

Notons encore qu'on a employé avec succès l'association *Streptokinase-Streptodornase* en aérosol dans les affections bronchiques. L'emploi intraveineux de ces enzymes semblait se justifier pour dissoudre les

thrombus vasculaires de sang ou de fibrine, ce qui n'est pas réalisable avec les anticoagulants du type *Coumarine*. Il est cependant accompagné d'inconvénients assez sérieux, dus à des phénomènes de pyrexie, d'hypotension, de céphalée et allergiques consécutifs très probablement à la présence d'impuretés difficilement éliminables jusqu'à présent. On trouve pourtant dans la littérature spécialisée des citations ayant trait à l'injection de *Streptokinase* en perfusions intraveineuses qui ont été effectuées avec des produits hautement purifiés. Si cette application pouvait se généraliser, on aurait fait un progrès essentiel *puisqu'on connaît, en dehors de l'action lytique spécifique de l'association Streptokinase-Streptodornase, son influence favorable sur le taux du complément sérique et sur les facteurs de la coagulation sanguine.* D'après les récents travaux de R. Sartory, J. Meyer et leurs élèves, on peut succinctement schématiser les processus de coagulation sanguine et de fibrinolyse de la façon suivante :

Streptokinase

Antistreptokinase	Proactivateur spécifique (Anticorps)
↓	↓
Thrombokinase + Calcium	Complément (Chaînon C_1)
↓	↓
Thrombine	Profibrinolysine
↓	↓
Fibrinogène	Fibrinolysine
↓	↓
Fibrine	(Fibrine)
↓	↓
Coagulation	Lyse

A ce sujet, nous tenons à attirer l'attention sur *une récente publication* de Gross, Hartl, Koss et Rahn (33); ces auteurs ont employé une Streptokinase préparée par les « Behringwerke » pour réaliser la thrombolyse chez une cinquantaine de malades. Au point de vue indication de cette thérapie, et des méthodes de dosage de contrôle, ils donnent les renseignements suivants : au début ils avaient à leur disposition des *préparations streptokinasiques* à un taux de 50 000 à 100 000 *unités Christensen* pour un mg de substance sèche. A ce moment, ils n'ont pas employé des doses optimales d'activité par crainte de malaises chez les malades; ils se sont donc limités à des doses moyennes de 40 000 à 100 000 unités par perfusion, qui leur ont donné des résultats tellement satisfaisants qu'actuellement, avec une préparation plus purifiée et plus concentrée, ils ont maintenu sensiblement ces doses.

Gross *et ses collaborateurs* débutent avec une dose d'essai de 40 000 unités environ qu'ils mélangent à 400-500 cc de solution apyrogène de

glucose ou de soluté physiologique et qu'ils administrent en 4 à 5 heures. Si le système vasculaire l'exige, on peut introduire la même dose de *Streptokinase* dans la moitié du solvant physiologique. Ils doublent ensuite progressivement les doses de Streptokinase pour arriver à une dose quotidienne de 200 000 à 300 000 unités. La durée du traitement ne doit pas dépasser 6 jours, ceci parce que la possibilité de thrombolyse diminue rapidement avec l'âge du thrombus et pour éviter le danger d'hypersensibilisation ou de formation d'Antistreptokinases, qui peut se manifester facilement chez des malades ayant passé par *une infection streptococcique*. Nous n'insistons pas sur les méthodes de contrôle employées par ces auteurs, ni sur les inhibiteurs de la fibrinolyse utilisés comme antidotes et qui ressortent de notre schéma (Fig. n° 1). Les auteurs insistent sur les bons résultats cliniques ainsi obtenus et l'absence de phénomènes d'intolérance et d'accidents secondaires.

Les Antistreptokinases :

Bien que le sujet de notre travail ne touche pas au problème des *Antistreptokinases*, nous tenons à rapporter quelques faits à ce sujet. vu l'importance de ces anticorps par rapport à l'emploi thérapeutique des Streptokinases mêmes.

Le processus fibrinolytique peut être désorganisé dans l'organisme humain et animal par la présence d'inhibiteurs spécifiques ou non.

Les *inhibiteurs non spécifiques* interviennent surtout en freinant les activateurs du système fibrinolytique. L'*Antifibrinolysine* est l'un de ces facteurs non spécifiques; elle est en équilibre avec la *Fibrinolysine naturelle* du sang. En général, ces inhibiteurs non spécifiques sont thermolabiles et détruits à 90 % par un chauffage à 56° pendant 30 minutes. Nous serons obligé de revenir sur cette inactivation lors de l'exposé de notre technique de dosage de *Streptokinase*. Les anticorps non spécifiques ont un rôle important dans les réactions de défense de l'organisme humain, surtout dans les maladies infectieuses. Dans les affections rhumatismales avec fièvre on a pu constater, à côté d'autres symptômes cliniques, une augmentation du taux sanguin de ces inhibiteurs. D'autre part, il faut mentionner la *Cortisone et l'A.C.T.H.* qui interviennent comme facteur d'inhibition non spécifiques de la fibrinolyse.

Dans la catégorie des *anticorps spécifiques*, on range des inhibiteurs qui attaquent directement les principes activant la lyse par la *Streptokinase* et inhibent leur action. L'inhibiteur spécifique de la *Streptokinase* est l'*Antistreptokinase* qui est élaborée par un organisme infecté par des bactéries streptokinasogènes ou par une vaccination au moyen de cet antigène. Ces anticorps spécifiques sont thermostables et migrent à l'électrophorèse avec les γ-globulines. La *Streptokinase* est notoirement un antigène faible, *mais un antigène tout de même*, puisque, lors des infections à Streptocoques hémolytiques, on constate toujours une augmentation du taux de l'*Antistreptokinase*.

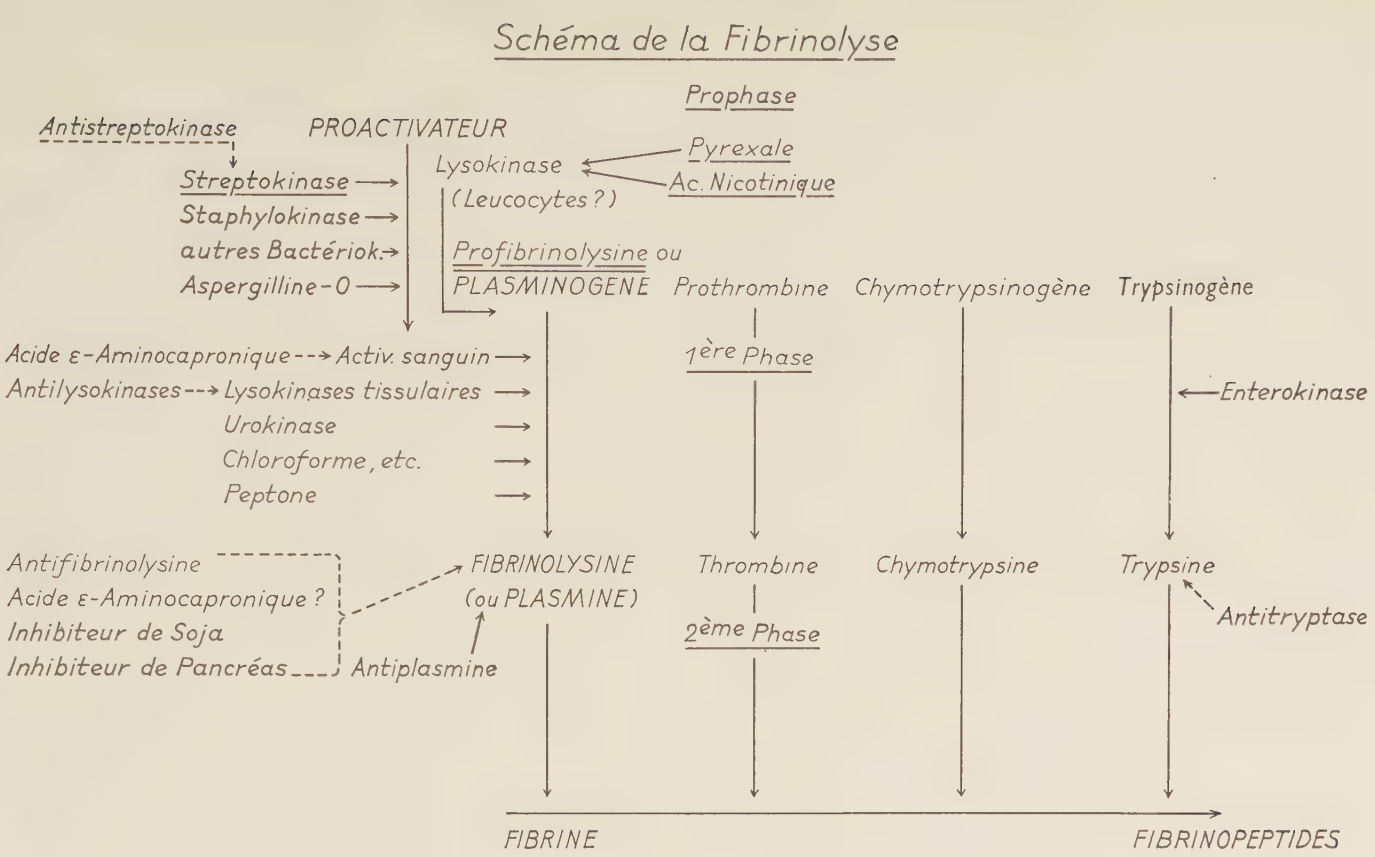


Fig. N° 1

Schéma des processus de la fibrinolyse.

Légende: Flèches en trait plein : proactivateurs et activateurs de la fibrinolyse.
Flèches en trait pointillé : inhibiteurs et agents antagonistes de la fibrinolyse.

En effet, nous pouvons déceler dans le sang de la plupart des individus adultes un certain taux d'*Antistreptokinase* puisque pratiquement chaque homme a été en contact avec le *Streptocoque hémolytique* au cours de son existence. On a dosé dans le sang de sujets atteints d'infections streptococciques aiguës ou latentes des taux d'*Antistreptokinase* variant dans d'assez larges limites, suivant les auteurs et les méthodes employées. Frey a pu constater que des taux de 100 U/cc sont déjà élevés, mais peuvent être largement dépassés, et *il considère des valeurs de* 20 à 80 *U/cc comme normales.*

Après avoir ainsi rapporté l'historique des différents facteurs intéressant notre sujet, nous allons à présent exposer nos recherches personnelles.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

DOSAGE DE LA STREPTOKINASE AU MOYEN DU THROMBOGRAPHE DE HIRTZ

L'appareil construit par HIRTZ et appelé *Thrombographe* était initialement destiné à la mesure clinique du temps de coagulation près du lit du malade. Son principe repose sur l'enregistrement du degré de viscosité du gel fibrineux qui se forme au cours du processus de coagulation dans le sang à examiner. Nous donnons ci-après une photographie et le schéma du Thrombographe.

L'appareil est muni d'une balance très sensible à poids de gravité bas, qui réagit en rapport direct avec les effets frénateurs (rigidité croissante) du gel fibrineux en formation. La balance porte à ses deux bras horizontaux deux plongeurs cylindriques en acier poli V2A, mesurant 2,5 cm × 0,1 cm. L'un des plongeurs (*expérience*) trempe dans une cuve cylindrique en acier poli prévue pour la réception du sang à étudier. Cette cuve est munie d'un thermostat permettant un chauffage stable à 37°. L'autre plongeur tient la balance en équilibre; il trempe dans une solution de même densité que le sang, contenue dans la *cuve témoin*. Les deux cuves sont en mouvement vertical périodique. Chaque période correspond à 12 secondes pour parcourir un espace libre de 1,5 cm de haut en bas et vice-versa. Dès que la rigidité croissante du sang en coagulation se répercute sur le plongeur d'expérience, la balance oscille et transmet le degré de rigidité sur une bande de papier en mouvement synchronisé. L'enregistrement des oscillations de la balance en fonction du temps continue automatiquement, il est directement lisible sur une bande de papier à déroulement régulier. Chaque oscillation périodique correspond à 12 secondes et est marquée par un point noir. Chaque cinquième période, égale à une minute, est notée par un point rouge. Cette technique permet donc de suivre directement le déroulement du phénomène de coagulation.

Avant de procéder au dosage proprement dit, il faut allumer le thermostat portatif et le système de chauffage de l'appareil. Dès que la

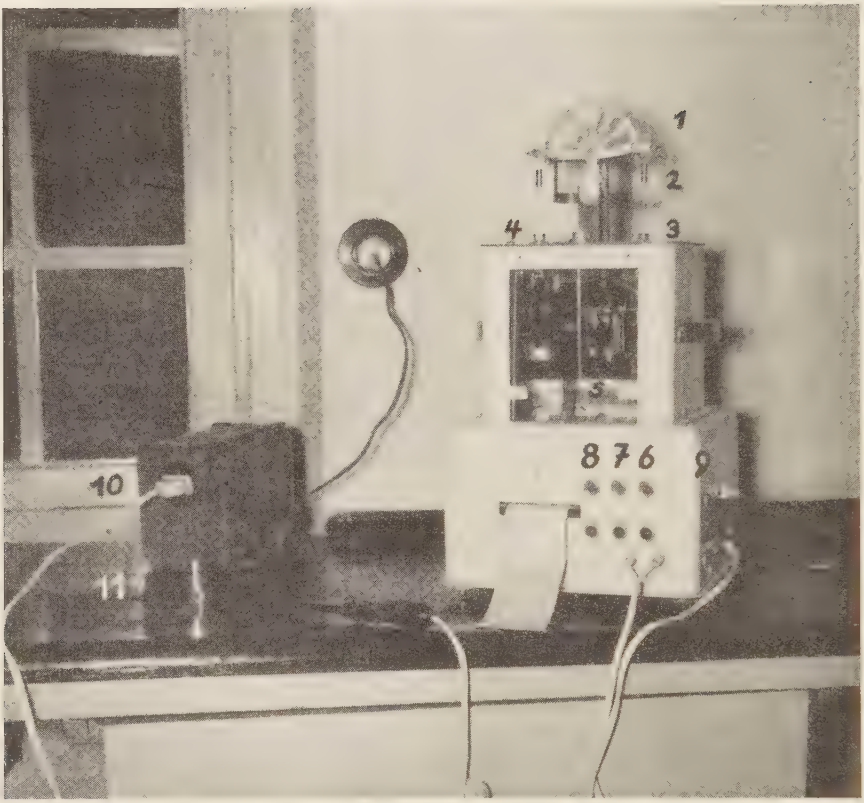


Fig. N° 2
Thrombographe de HIRTZ.

1. Balance de précision ; 2. Plongeurs ; 3. Cuvette témoin ; 4. Cuvette pour le sang : 5. Enregistreur automatique ; 6. Commutateur du thermostat de prélèvement ; 7. Commutateur du thermostat de la cuvette d'expérience ; 8. Commutateur de l'enregistreur automatique ; 9. Commutateur d'éclairage ; 10. Transformateur ; 11. Manipulateur avec thermostat pour le prélèvement de sang du malade.

température de 37° est atteinte, signalée par un spot lumineux, on prélève le sang chez l'homme ou l'animal en expérience, par ponction veineuse. On rejette les premières gouttes qui s'écoulent de l'aiguille pour recueillir le sang directement dans la cuve d'expérience. Le remplissage s'effectue rapidement. Dès que la cuve est pleine, on couvre le sang d'une goutte de silicone puis on dispose la cuve dans l'appareil et l'enregistrement commence aussitôt. La viscosité du sang est automatiquement enregistrée toutes les 12 secondes sur la bande de papier.

Dès que la première goutte de sang est recueillie dans la cuve, on déclenche un chronomètre pour mesurer le temps de remplissage et de mise en marche du système enregistreur du Thrombographe. *Les prélèvements dont les temps de remplissage dépassent* 45 *secondes sont à rejeter.*

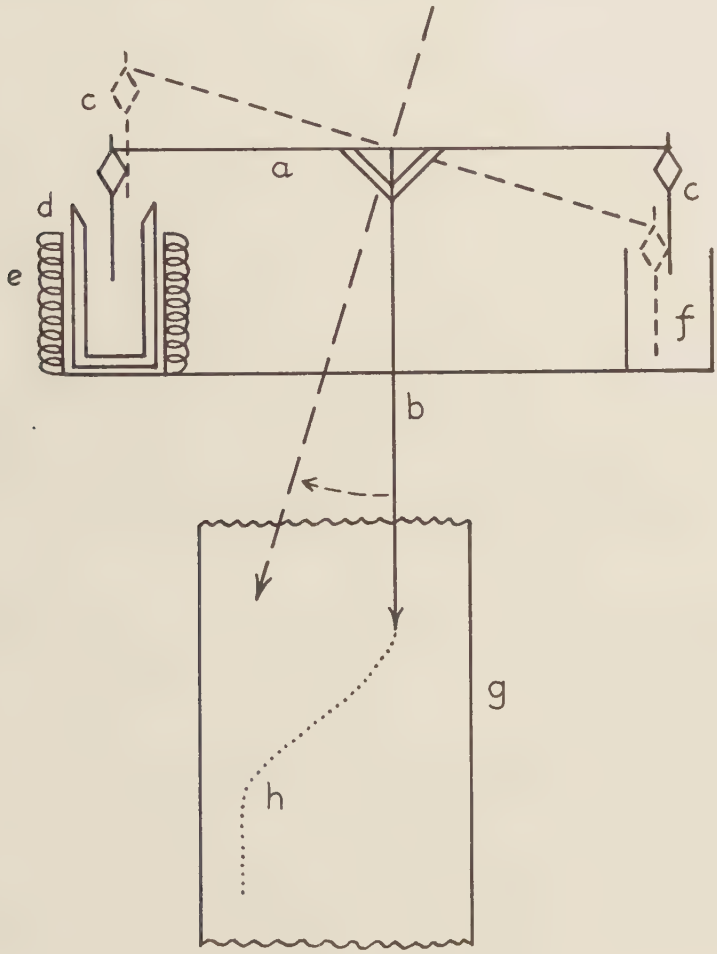


Fig. N° 3

Schéma du système de balance du Thrombographe.

Le temps de coagulation du sang humain normal est en moyenne de 15'30"; pour le lapin, il est de 14'30". Nous reproduisons dans la figure ci-après la courbe de coagulation du sang de lapin normal :

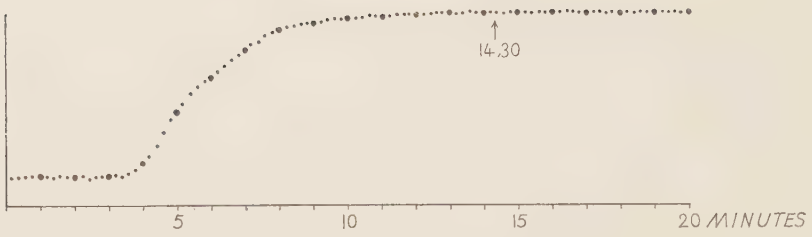


Fig. N° 4

Courbe de coagulation d'un sang de lapin normal.

Comme on le voit, le tracé commence à gauche avec une phase initiale horizontale, puisque la viscosité du sang fraîchement prélevé correspond encore à celle de la solution témoin. Après environ 5 minutes, *le taux de Thrombine* libérée est suffisant pour activer la formation de la *Fibrine*. La viscosité du sang augmente par conséquent et on note une montée rapide de la courbe. *Le début de cette montée et son importance diffèrent d'un individu à l'autre, mais le temps de coagulation intégrale est compris dans des limites inférieure et supérieure pour des sujets normaux.*

Emploi du Thrombographe de Hirtz pour le dosage de la Streptokinase :

Jusqu'à présent, on avait recours pour le dosage de la *Streptokinase* à la méthode de Christensen que nous avons décrite plus haut. L'emploi du *Thrombographe* de Hirtz nous semble cependant apporter des avantages importants, comme Frey a déjà pu le démontrer.

Le processus de lyse du caillot fibrineux est enregistré sans interruption et peut être contrôlé à chaque moment. D'autre part, cette méthode n'exige que de très petites doses de réactif et principalement de *Streptokinase.*

Afin de pouvoir déterminer le *taux de Streptokinase contenu dans nos filtrats de culture de Streptocoque hémolytique*, nous avons été obligé d'étudier l'influence de doses progressivement croissantes de cette kinase sur un système de coagulation constant ; en effet, il serait impossible d'évaluer la lyse au moyen de sang humain fraîchement coagulé, *puisque le temps de lyse est largement dépendant du taux de Fibrine ou d'Antistreptokinase présent dans ce sang.* Nous avons eu recours au système de coagulation artificiel éprouvé par Frey :

Sérum humain inactivé	0,05 cc
Solution de Streptokinase	0,10 cc
Solution de Fibrinogène à 0,6 %	0,35 cc
Solution de Thrombine (40 U/cc)	0,05 cc

soit au total 0,55 cc, quantité nécessaire pour remplir exactement la cuve du Thrombographe.

Frey a surtout utilisé ce système de coagulation artificielle pour doser l'*Antistreptokinase* dans un sérum pathologique, toujours relativement élevée. D'autre part, le principe essentiel de ce dosage réside dans le fait d'*inhiber complètement la lyse par la Streptokinase introduite à dose connue et nécessaire pour la neutralisation de l'Antistreptokinase*, c'est-à-dire que d'après cette conception, ce n'est pas le temps de lyse qui importe, mais l'inhibition complète de cette lyse. Étant donné que la lyse provoquée par la quantité de *Streptokinase* normalement présente dans *un filtrat de culture streptococcique*, est relativement longue et difficile à enregistrer sur la courbe d'étalonnage, nous avons été obligé de modifier la composition du système de coagulation artificiel de Frey. Après un grand nombre d'essais, nous avons finalement adopté le caillot fibrineux suivant :

Sérum humain inactivé	0,05 cc
Dilution de Streptokinase (filtrat de culture) .	0,20 cc
Solution de Fibrinogène à 0,8 %	0,25 cc
Solution de Thrombine à 40 U/cc	0,05 cc

Ainsi, nous avons en principe toujours une quantité double de Streptokinase dans la cuve d'expérience, par rapport au système de coagulation de Frey, ce qui a pour effet de raccourcir le temps de lyse, permettant une évaluation quantitative plus exacte.

Nous avons employé le sérum humain préparé selon les indications de Frey ; comme *Streptokinase*, nous avons eu recours à la *Varidase Lederle* [Tillet (34)]. La solution à 2 000 U/cc habituellement employée ne se conserve, d'après nos constatations, que pendant 4 à 5 jours au maximum.

Nous avons eu recours au *Fibrinogène de bœuf de Behring* à la concentration de 0,3 % ; ce Fibrinogène fournit un gel de Fibrine suffisamment consistant pour nos expériences à l'aide du *Thrombographe de* Hirtz. Le gel ne doit pas présenter de phénomènes thixotropes, résultant du frottement par le plongeur, qui pourraient simuler une lyse prématurée. Il est également souhaitable d'obtenir une fluidification régulière du gel fibrineux, sans formation de flocons pouvant rester accrochés au plongeur, donnant ainsi une courbe de lyse irrégulière, difficile à interpréter.

La solution de *Fibrinogène* à la concentration de 0,8 %, introduite dans la cuve avant l'addition de *Thrombine*, répond favorablement à ces exigences.

Nous avons employé comme *Thrombine* la *Topostasine Roche*, constituant une enzyme de coagulation déjà activée et standardisée. La *Topostasine* est préparée à partir de plasma de bœuf et renferme 3 000 Unités de Thrombine lyophilisée par ampoule, selon la définition internationale.

Nous avons tout d'abord préparé les solutions suivantes :

SOLUTION DE STREPTOKINASE :

Nous avons préparé une solution-mère à 4 000 U /cc de *Streptokinase* dans le soluté physiologique.

SOLUTION DE FIBRINOGÈNE :

On dissout 8 mg de Fibrinogène dans 0,3 cc de soluté physiologique; on immerge la poudre pour réalisèr le gonflement du Fibrinogène, puis on ajoute 0,7 cc de soluté physiologique. On dispose à 37° jusqu'à dissolution complète. Cette solution est encore utilisable le lendemain, si on la conserve sous une trace de toluène et à la glacière.

SOLUTION DE THROMBINE :

On dissout 40 unités (U.N.I.H.) de Thrombine dans 1 cc de soluté physiologique. La dissolution est instantanée. (U.N.I.H. = *Unité National Institute of Health*).

MODE OPÉRATOIRE :

On déclenche le thermostat du Thrombographe; après extinction des signaux de contrôle rouges, on introduit dans la cuve d'expérience le sérum humain inactivé, puis la dilution de *Streptokinase*, on laisse agir pendant 15 minutes pour neutraliser les *Antistreptokinases* éventuellement présentes dans le sérum. Dans les expériences présentes, nous avons utilisé un sérum humain titrant 20 U /cc d'*Antistreptokinase*, déterminé d'après la méthode de FREY. Ce fait a une importance capitale pour le dosage de quantités relativement faibles de *Streptokinase*. Après cette réaction de neutralisation on ajoute la solution de *Fibrinogène*. Finalement, on introduit la *Thrombine* ce qui occasionne une coagulation presque instantanée du substrat. Il importe par conséquent de mettre l'appareil en marche immédiatement après addition de la *Thrombine* et de chronométrer le temps écoulé jusqu'à l'enregistrement automatique de la première période de 12 secondes. La courbe de coagulation au moyen du *substrat réactionnel artificiel* évolue au début d'une façon très raide, ce qui indique la rapidité de la coagulation. L'optimum de viscosité est déjà obtenu après 2 minutes: cette coagulation ne pouvait pas être freinée par la présence de doses de *Streptokinase* de 150 Unités ou plus.

Définition du temps de lyse:

Au cours de nos expériences avec différentes doses de *Streptokinase*, *nous définissons le temps de lyse par la durée qui s'écoule entre l'introduction de la Thrombine dans le substrat réactionnel et le retour à la viscosité initiale.* Ainsi, nous saisissons aussi les cas où la Streptokinase agit déjà au cours de la formation du caillot fibrineux.

La courbe d'étalonnage a été établie pour des doses entre 2,5 et 25 U. de Streptokinase, c'est-à-dire dans l'ordre de grandeur prévisible pour nos expériences ultérieures.

Les résultats que nous indiquons représentent la moyenne d'au moins 6 mesures, étant donné que les processus de coagulation et de lyse sont des réactions physiologiques pouvant largement varier et ne permettent pas de tirer une conclusion d'une seule expérience.

Nous rapportons dans le tableau suivant les rapports entre les temps de lyse et les doses de Streptokinase introduites dans le substrat réactionnel standard.

TABLEAU N° 1

Streptokinase ajoutée U/cc	Streptokinase active U/cc	Temps de lyse en minutes
2,5	1,5	25'12''
3,0	2,0	23'12''
4,0	3,0	21'
5,0	4,0	19'12''
7,5	6,5	16'24''
8,0	7,0	16'
9,0	8,0	15'24''
10,0	8,5	15'
12,5	11,5	13'12''
15,0	14,0	12'
17,5	16,5	11'12''
20,0	19,0	10'12''
25,0	24,0	9'

Nous donnons ci-dessous une courbe de Fibrinolyse illustrant le temps de lyse enregistré pour 8 U/cc de Streptokinase ajoutée dans notre système de coagulation standard.

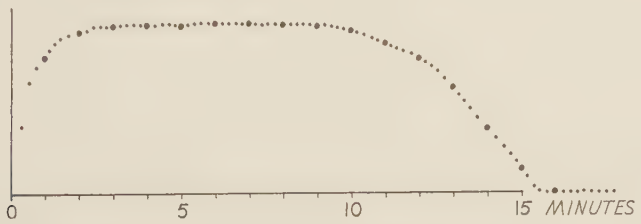


Fig. N° 5

Influence de diverses doses de Streptokinase sur le temps de lyse de notre système de coagulation standard (8 U/cc de Streptokinase ajoutée).

Nous avons porté ces valeurs dans un système de coordonnée, en inscrivant les *unités de Streptokinase* en ordonnée et le *temps de lyse* en abscisse. Nous avons ainsi obtenu la courbe en hyperbole suivante :

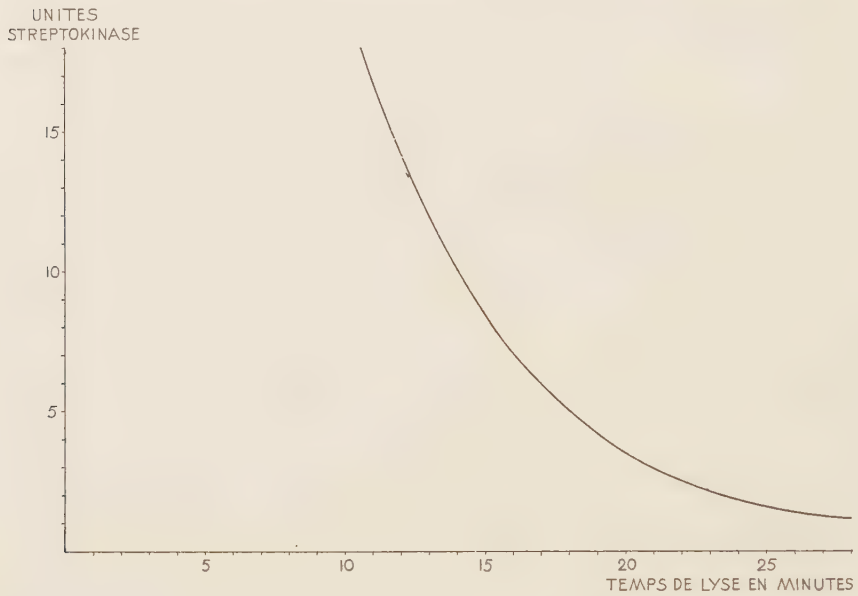


Fig. N° 6

Courbe permettant de déterminer les unités de Streptokinase dans un substrat enzymatique par rapport au temps de lyse de notre système de coagulation standard.

Cette courbe permet de déterminer les unités de Streptokinase dans un substrat enzymatique par rapport au temps de lyse.

CHAPITRE IV

DÉTERMINATION DE LA PRODUCTION DE STREPTOKINASE DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE STREPTOCOQUES

Toutes nos souches provenaient de la « *National Collection of Type Cultures* » *de Londres* sous forme lyophilisée. Le contenu de chaque ampoule a été repris dans quelques gouttes de milieu de culture, puis ensemencé en milieu liquide. Nous avions ainsi à notre disposition :

— *Streptocoques* β-*hémolytiques du groupe* A : N° 8326-8330-9994.

Streptocoques β-*hémolytiques du groupe* C : N° H 46a - H 64.

En nous basant sur les travaux de Ochsner (35) et de Frey, nous avons eu recours au *Bacto Brain Heart Infusion Difco (B 34 dehydrated)* de composition :

Calf brains, Infusion from	200 cc
Beef Heart, Infusion from	250 cc
Proteose Peptone Difco	10 g
Bacto Dextrose	2 g
Sodium chlorid	5 g
Disodium phosphat	2,5 g

On dissout 37 g de cette poudre déshydratée dans 1 litre d'eau et on stérilise le tout pendant 15 minutes à 120°.

Les cultures des *Streptocoques* n° 8326 et 8330, ainsi que H 46a et H 64, montraient déjà un développement satisfaisant après 12 heures. Par contre, *la souche* n° 9994 ne présentait qu'un développement chétif après 40 heures. Après adaptation de toutes les souches à notre milieu, la croissance était satisfaisante après 16 heures.

Recherche du taux de Streptokinase dans les filtrats de culture :

A ce sujet, nous avons eu recours à la méthode antérieurement décrite *en remplaçant la dose de Streptokinase connue par* 0,2 *cc du filtrat de culture à examiner*, que l'on introduit dans le système de coagulation standard.

En nous référant à la courbe d'étalonnage (Fig. n° 6) on pouvait déterminer le *taux de Streptokinase* dans le filtrat en expérience en rapport avec le temps de lyse. *Le taux d'Antistreptokinase* du sérum humain utilisé a été préalablement déterminé d'après la méthode de FREY.

Toutes les souches ont été ensemencées simultanément et dans les mêmes conditions dans le *Brain Heart Infusion*. La culture était effectuée à 37° et le *taux de Streptokinase* déterminé après 12 - 16 - 20 - 24 et 48 heures de culture. Nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 2

Souche Streptocoque	Taux de Streptokinase en U/cc après culture de				
	12 h.	16 h.	20 h.	24. h.	48 h.
Groupe A					
8 326	25	35	40	40	35
8 330	20	25	25	20	10
9 994	0	10	10	0	0
Groupe C					
H 46a	50	70	75	70	60
H 64	60	60	70	70	70

Ces valeurs sont les moyennes des résultats obtenus pour plusieurs tubes de chaque souche. Dans l'ensemble, *on constate que toutes les souches sont plus ou moins productrices de Streptokinase*. La souche n° 9994 constitue cependant une exception, puisque sur les cinq séries d'expériences il n'y en avait que deux de positives, *et encore la quantité de Streptokinase occasionnant la lyse du système de coagulation standard était trop faible pour permettre une interprétation quantitative précise au moyen du Thrombographe.*

Les deux souches de *Streptocoques du groupe* C sont de très bons producteurs de Streptokinase.

Quant au rapport entre la durée de culture et le taux de Streptokinase, il est intéressant de noter que l'optimum de rendement se situe entre 16 et 24 heures de culture. Après ce temps, on constate une nette diminution chez toutes les souches. Nous donnons dans la planche quelques exemples de courbes enregistrées en rapport avec le temps de culture des souches.

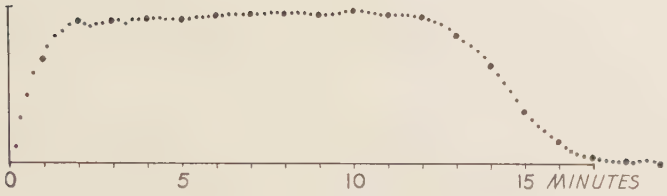


Fig. N° 7

Courbe de fibrinolyse due à la souche de Streptocoque groupe A N° 8 330 cultivée pendant 16 heures à 37°.

18 minutes = 5 U Streptokinase dans 0,2 cc, donc 25 U/cc.

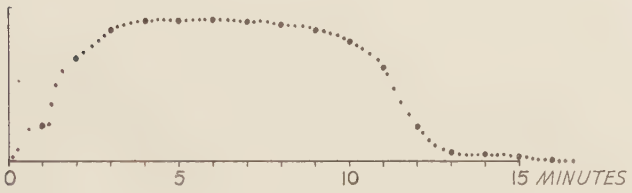


Fig. N° 8

Courbe de fibrinolyse due à la souche de Streptocoque groupe C N° H 46a cultivée pendant 12 heures à 37°.

14 minutes = 10 U Streptokinase dans 0,2 cc, donc 50 U/cc.

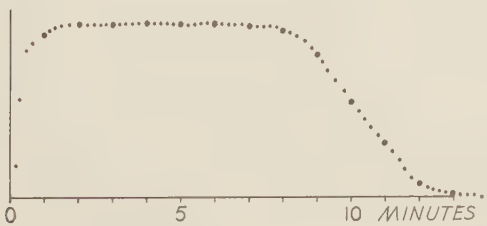


Fig. N° 9

Courbe de fibrinolyse due à la souche de Streptocoque groupe C N° H 46a cultivée pendant 20 heures à 37°.

13 minutes = 12 U Streptokinase dans 0,2 cc, donc 60 U/cc.

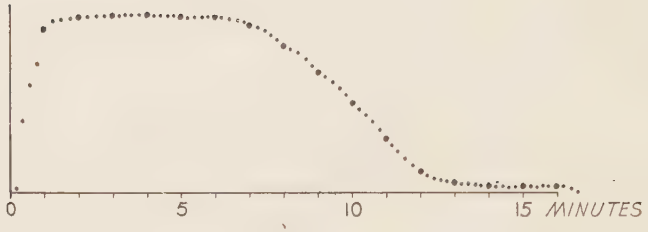


Fig. N° 10

Courbe de fibrinolyse due à la souche de Streptocoque groupe C N° H 64 cultivée pendant 12 heures à 37°.

14 minutes = 10 U Streptokinase dans 0,2 cc, donc 50 U/cc.

D'après CHRISTENSEN, la diminution de la croissance et de la production enzymatique est principalement due à une concentration trop forte en Acide lactique, apparaissant dans les cultures d'un certain âge. Un séjour à 37° au-delà de 24 heures *non seulement freine la croissance, mais encore amène une destruction de la Streptokinase déjà formée.*

Par la suite, nous avons par conséquent adopté un temps de culture de 20 heures pour toutes nos souches de *Streptocoques*, et ceci en opposition avec les travaux antérieurs, qui limitent le temps de culture à 16 heures. Cette modification se justifie, puisque dans la plupart de nos expériences préliminaires, *nous avons pu constater encore une augmentation du taux de Streptokinase au cours de ces quatre heures supplémentaires.*

Contrôle de la stabilité de nos Streptokinases :

Les cultures âgées de 20 heures ont été filtrées à travers un *filtre de Iéna* III G 5 pour obtenir un filtrat stérile. Ce filtrat était fractionné en trois parties pour doser la *Streptokinase* au moyen de notre méthode. Ces trois fractions ont été conservées à des températures de 5 - 10° (glacière), 19 - 23° (température du laboratoire) et 37° (étuve) : le *taux de Streptokinase* a été déterminé pour chaque échantillon après 6 - 24 - 48 - 72 heures de séjour à ces températures. Pour ces expériences, nous avons eu recours aux souches suivantes : *Streptocoque groupe A N°* 8326; *Streptocoque groupe C N°* H 46a et H 64. Nous donnons les résultats de ces essais dans le tableau suivant.

TABLEAU N° 3

Souche N°	Temps de conservation	Streptokinase U/cc					
		Essai N° 1			Essai N° 2		
		Température :					
		5°	20°	37°	5°	20°	37°
8 326	taux initial			40			35
	6 heures	40	35	30	35	30	15
	24 heures	40	20	20	40	10	10
	48 heures	30	10	0	30	10	0
	72 heures	20	0	0	25	0	0
H 64	taux initial			60			55
	6 heures	60	60	35	55	50	35
	24 heures	60	40	15	55	55	15
	48 heures	60	30	10	45	30	0
	72 heures	55	25	0	45	20	0
H 46a	taux initial			70			60
	6 heures	70	60	30	60	50	35
	24 heures	70	10	10	60	10	15
	48 heures	60	10	10	30	5	5
	72 heures	40	5	0	30	5	0

A titre documentaire nous rapportons ici deux courbes des filtrats de cultures des Streptocoques, groupe C N° H 46a et N° H 64, conservés pendant 24 heures à 20°, respect. 37°.

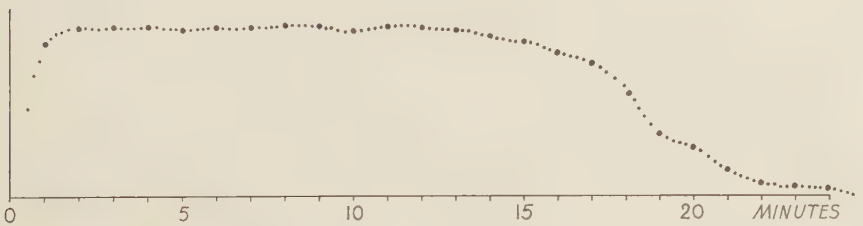


Fig. N° 11

Courbe de fibrinolyse due à la souche de Streptocoque groupe C N° H 46a cultivée pendant 20 heures à 37°; Streptokinase conservée pendant 24 heures à la température du laboratoire (à comparer avec Fig. N° 9).

23 minutes = 2 U Streptokinase dans 0,2 cc, donc 10 U/cc.

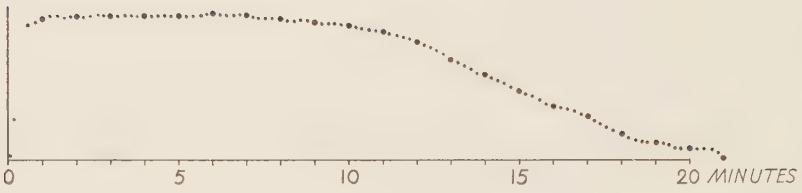


Fig. N° 12

Courbe de fibrinolyse due à la souche de Streptocoque groupe C N° H 64 cultivée pendant 20 heures à 37°; Streptokinase conservée pendant 24 heures à 37° (à comparer avec Fig. N° 10).

21 minutes = 3 U Streptokinase dans 0,2 cc, donc 15 U/cc.

Interprétation :

En considérant les résultats obtenus après conservation à la glacière, on constate que la Streptokinase élaborée par les trois souches se conserve sans inconvénient pendant 24 heures, bien qu'il s'agisse de concentrations relativement faibles. Après 48 heures, la *souche* 8326 montre déjà une diminution marquée, s'évaluant à environ 25 % et après 72 heures l'activité streptokinasique de cette souche n'est plus que de 50 %.

La Streptokinase de la *souche* H 46a, semble un peu plus résistante: après 48 heures de séjour à la glacière, le taux de Streptokinase a baissé de 13 % environ, tandis qu'après 72 heures, la diminution atteint 42 %.

Une constatation intéressante a été faite avec la *Streptokinase de la souche* H 64, puisqu'après 72 heures de séjour à la glacière, la diminution de son activité est très faible. Pour cette raison, nous avons conservé le filtrat pendant 10 jours encore à la glacière. Pour un échantillon nous avons dosé encore au moins 75 % de l'activité initiale au bout de ce temps; pour le second échantillon, elle était légèrement plus faible. *Etant donné qu'à cette période l'activité streptokinasique des filtrats des deux autres souches était pratiquement tombée à zéro, il faut admettre que les Streptokinases élaborées par les différentes souches de Streptocoques se différencient nettement quant à leurs propriétés physico-chimiques.*

Les résultats obtenus avec les filtrats conservés à la température du laboratoire étaient moins surprenants : On note que les Streptokinases sont des corps très labiles, puisque cette température moyennement élevée accélère leur destruction par réactions d'hydrolyse ou de dégradation, et ceci surtout puisqu'il ne semble pas exister dans le bouillon de culture un stabilisateur spécifique. Les Streptokinases des *deux souches* N° 8326 et H 46a présentent déjà après 24 heures une nette diminution et les filtrats conservés plus que 48 heures à la température du laboratoire ne sont plus utilisables. *Ici aussi, la Streptokinase H 64 est la plus stable*, puisqu'après 6 heures son activité est pratiquement intacte et après 24 heures, elle est encore plus forte que celle des autres échantillons.

Le séjour à 37° donne des résultats indubitables; l'*activité des Streptokinases est déjà nettement affaiblie après 6 heures de conservation et dans la plupart des expériences, nous n'avons plus pu déceler d'activité streptokinasique après 48 heures.* Même la Streptokinase de la souche H 64 de constitution beaucoup plus stable n'a pas résisté à ce mode de conservation.

De l'ensemble de ces recherches nous pouvons conclure qu'en l'absence d'un stabilisateur spécifique les solutions diluées de *Streptokinase* ne peuvent être conservées qu'à la glacière et même dans ces conditions un temps de conservation de 24 heures ne devrait pas être dépassé.

Après avoir ainsi examiné l'activité des *Streptokinases* en milieu habituel, *nous allons essayer d'augmenter leur production par addition au milieu de culture de divers facteurs stimulants.*

CHAPITRE V

INFLUENCE DE DIVERSES VITAMINES SUR LA PRODUCTION DE STREPTOKINASE

Nous avons fait appel à ces facteurs de croissance, puisqu'on mentionne dans la littérature spécialisée qu'ils ont une action activante sur les autres enzymes streptococciques d'adaptation (*Hyaluronidase*, etc.). C'est ainsi que Rogers (36) prétend avoir obtenu une *amélioration de la production d'Hyaluronidase par addition de Thiamine et d'Acide nicotinique*. Cet auteur a travaillé sur des souches de Staphylocoques dorés et avec des milieux de culture synthétiques. En outre, il a pu constater *que la Pyridoxine et le Glucose n'interviennent pas dans la genèse des Hyaluronidases*. Gœtz (36) a continué ces travaux et d'après lui il semble probable que la genèse des *Hyaluronidases streptococciques* dépende d'un métabolite comprenant la *Thiamine et des Phosphates* permettant la formation de molécules de *Diphosphothiamine* indispensables pour le métabolisme protidique de ces germes.

Comme la *Streptokinase* est une enzyme à noyau protéinique, nous avons jugé nécessaire d'étudier également l'influence de *différentes vitamines* sur sa production.

Nous avons ainsi eu recours au *Pantothénate de calcium*, au *Nicotinamide*, à la *Thiamine* et à l'*Acide ascorbique*. Nous donnons un bref résumé des caractères de ces vitamines.

L'*Acide pantothénique* est une substance huileuse, jaunâtre, visqueuse et assez hygroscopique. Il est soluble dans l'eau et dans l'alcool en solution acide. Il est stable à la lumière et en présence d'oxygène, mais par contre très sensible à la chaleur, aux alcalis et aux acides. Seul l'*Acide pantothénique dextrogyre* est biologiquement actif. Pour nos essais, nous avons eu recours au *Pantothénate de calcium* à propriétés stables et bien définies. Il s'agit d'une poudre blanche, microcristalline, légère, sans odeur. Ce sel résiste à la chaleur et à l'oxygène, il est facilement soluble dans l'eau en donnant une solution légèrement alcaline.

Le dosage microbiologique est d'habitude effectué au moyen du *Lactobacillus arabinosus* 17-5, du *Proteus morganii* ou avec des *Levures*.

L'*Amide de l'Acide nicotinique* est une poudre cristalline blanche, à odeur caractéristique faible et à saveur amère et salée. Il est facilement soluble dans l'eau, dans l'alcool, difficilement dans l'éther et insoluble

dans les huiles. Son point de fusion se situe entre 126° et 128°. Le *Nicotinamide* est résistant à la chaleur et aux réactifs d'oxydation, il est sensible aux alcalis et aux sels d'argents. Sa solution aqueuse est neutre au tournesol. Pour le dosage, on connaît des méthodes chimiques et microbiologiques. Une des méthodes chimiques est une technique colorimétrique au moyen du 2,4-*dinitrochlorobenzène*. Les méthodes biologiques ont recours soit à *Proteus morganii*, soit à *Lactobacillus arabinosus* par néphélométrie. Au moyen du dernier germe, on peut également effectuer une méthode titrimétrique en dosant l'Acide lactique formé.

La *Thiamine ou Vitamine* B_1 est une poudre cristalline blanche ou très légèrement jaunâtre, à odeur de levure. Son point de fusion est de 250° ; elle est facilement soluble dans l'eau, difficilement soluble dans l'alcool (1/100), insoluble dans l'éther, le benzène et les huiles. Les solutions neutres ou légèrement alcalines se décomposent rapidement en prenant une teinte sombre, réaction facilitée au contact de l'air et de l'oxygène. La *Thiamine* est sensible à l'action des métaux lourds et, par oxydation alcaline, elle se transforme en *Thiochrome* à fluorescence bleuâtre. Pour le dosage on peut employer des méthodes physico-chimiques, par exemple le *test au Thiochrome* où l'on mesure l'intensité de fluorescence aux rayons ultraviolets; pour les méthodes microbiologiques, on peut mesurer l'intensité de fermentation due à *Saccharomyces cerevisiae*, ou employer des techniques néphélométriques en recourant à *Streptococcus salivarius* ou *Lactobacillus fermenti* 36. Mentionnons à ce sujet la méthode de Schopfer au moyen de *Phycomyces blakesleanus*.

L'*Acide ascorbique ou Vitamine C* est une poudre cristalline, blanchâtre ou légèrement jaunâtre, d'une odeur faible caractéristique et de saveur acide. Son point de fusion est de 192°. En milieu légèrement acide, elle est facilement soluble dans l'eau (1 3), plus difficilement dans l'alcool (1/30) et insoluble dans le benzène, le chloroforme, l'éther et les huiles. L'*Acide ascorbique lévogyre* est caractérisé par son pouvoir réducteur prononcé; il est stable à l'abri de la lumière, résiste à la chaleur en solution neutre ou acide, mais en absence d'oxygène. A l'air libre, il se décompose facilement au froid et à la chaleur et ceci surtout en réaction alcaline. La *Vitamine C* est très sensible aux réactifs d'oxydation et aux catalyseurs d'oxydation, tels que le fer par exemple. Dans les tissus humains et animaux, *il existe un équilibre entre le taux d'Acide ascorbique lévogyre et celui de son produit d'oxydation réversible, l'Acide déhydroascorbique*. Pour son dosage, on emploie d'habitude une méthode chimique titrimétrique en présence de *Dichlorophénol-indophénol*. Il existe également des méthodes microbiologiques.

Dans le tableau suivant, nous donnons la solubilité dans l'eau de ces différentes vitamines et la concentration habituellement utilisée dans les milieux de culture-test.

TABLEAU N° 4

Vitamine	Solubilité	Concentration en γ/cc
Thiamine	1/1	0,002
Amide nicotinique	1/2	0,08
Pantothénate de calcium	1/1	0,04
Acide ascorbique	1/3	0,10

Nous avons effectué nos expériences avec les souches de *Streptocoques du groupe* C N° H 64 et H 46a. Le milieu de culture était le *Difco Bacto Brain Heart Infusion.*

Protocole expérimental :

Pour étudier l'influence de chacune des vitamines sur la production de *Streptokinase*, nous avons chaque fois ensemencé six tubes de culture à l'aide de chacune de nos deux souches. Deux de ces tubes servaient de témoins; dans les quatre autres nous avons introduit la vitamine en expérience. Chaque tube contenait exactement 10 cc de bouillon; l'ensemencement et les conditions culturales étaient identiques pour tous les tubes. Les cultures étaient disposées à 37° pendant 20 heures. A ce moment, on passe à la filtration et on effectue au moins deux dosages dans le courant des deux heures suivantes. Ces valeurs sont à considérer comme les plus rigoureuses; nous avons cependant effectué deux dosages supplémentaires 4 heures après l'interruption de la culture.

Nous avons préparé des solutions-mères des vitamines en dissolvant 1 mg de chaque vitamine dans 100 cc d'eau distillée stérile; par conséquent 0,05 cc de solution correspondent à 0,5 γ de vitamine. Les doses de solution de vitamine introduites dans les milieux de culture étaient les suivantes :

Thiamine ..... 0,05 cc/10 cc = 0,05 γ/cc
Amide nicotinique ..... 0,10 cc/10 cc = 0,10 γ/cc
Pantothénate de Calcium ..... 0,05 cc/10 cc = 0,05 γ/cc
Acide ascorbique ..... 0,10 cc/10 cc = 0,10 γ/cc

Comme parmi ces vitamines il en est qui ne sont pas thermostables, telle la *Thiamine* par exemple, nous avons renoncé à la stérilisation à l'autoclave, mais avons tyndallisé une heure toutes les solutions-mères à 70° pendant trois jours consécutifs. Les doses adéquates étaient ensuite introduites aseptiquement dans le milieu de culture. Nous donnons ci-dessous les résultats de ces essais :

TABLEAU N° 5

Vitamine	Streptokinase U/cc					
	Tubes N°				Témoins	
	1	2	3	4	5	6
	Streptocoque H 64					
Thiamine	60	70	60	70	60	70
Nicotinamide	55	65	65	70	70	60
Pantothénate de calcium	70	70	60	75	60	60
Acide ascorbique	60	55	65	65	65	65
	Streptocoque H 46a					
Thiamine	65	70	70	75	70	65
Nicotinamide	70	70	65	65	75	70
Pantothénate de calcium	75	75	70	75	65	70
Acide ascorbique	70	65	75	70	70	65

Il ressort de ces expériences que les *quatre vitamines ne semblent pas exercer d'action stimulante sur la production de Streptokinase* dans nos conditions expérimentales. A ce sujet, on peut faire valoir trois possibilités :

1° les concentrations en vitamine ajoutées sont trop faibles;

2° le milieu *Difco* contient les quantités optimales de vitamines nécessaires à la formation des *Streptokinases ;*

3° Les *Streptocoques* en expérience élaborent des *Streptokinases* sans avoir besoin des vitamines, ce qui semble cependant peu probable.

Pour élucider ce problème, nous avons effectué une nouvelle série d'expériences en augmentant les doses de vitamine. A cet effet nous avons préparé une nouvelle solution-mère de chaque vitamine, 100 fois plus forte que la précédente. Le taux de vitamine introduit dans notre milieu s'évaluait par conséquent comme suit :

Thiamine ..... 5 γ/cc,
Nicotinamide ..... 10 γ/cc,
Pantothénate de calcium..... 5 γ/cc,
Acide ascorbique ..... 10 γ/cc.

Toutes les autres conditions expérimentales sont restées identiques. Nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 6

Vitamine	Streptokinase U/cc					
	Tubes N°				Témoins	
	1	2	3	4	5	6
	Streptocoque H 64					
Thiamine	65	70	70	70	65	65
Nicotinamide	65	70	75	70	65	70
Pantothénate de calcium	70	75	65	75	65	60
Acide ascorbique	60	65	70	65	70	65
	Streptocoque H 46a					
Thiamine	70	75	75	70	65	70
Nicotinamide	70	70	65	70	65	70
Pantothénate de calcium	75	75	70	70	70	65
Acide ascorbique	70	65	65	70	70	70

De l'ensemble de cette série d'expériences on peut conclure que l'addition de *cette forte dose de vitamines ne semble pas influencer la production de Streptokinase.* Le seul résultat concret est que l'*Acide ascorbique* semble plutôt freiner cette production.

Nous avons ensuite contrôlé la *deuxième hypothèse*, en ayant recours à un substrat nutritif moins riche que le *Brain Heart Infusion Difco.* A ce sujet, nous nous sommes reporté aux expériences de ROGERS ayant trait à l'influence des vitamines sur les *Hyaluronidases.* Cet auteur a employé le centrifugat d'un milieu de culture sur lequel il avait préalablement fait pousser une jeune souche de *Staphylocoque.* Ce centrifugat appauvri en substances nutritives et facteurs de croissance par la première culture, a été ensuite ensemencé à l'aide d'*un nouvel inoculat* provenant d'une culture âgée de 12 heures. L'auteur a pu constater que dans ces conditions, le développement des germes s'effectue normalement, mais le *taux d'Hyaluronidase* formée est réduit de 90 à 98 %. Il en conclut que dans ce milieu, ayant servi à une *première culture et réemployé une seconde fois*, il devait manquer un métabolite ou un facteur de croissance nécessaire à la production des enzymes d'adaptation. Dans ses expériences, l'addition de glucose s'est montrée inefficace pour réparer ce dommage, alors que la Thiamine a un effet sélectif sur la production d'*Hyaluronidase.*

On peut donc en conclure qu'un déficit de certaines substances nutritives ou de facteurs de croissance nettement définis peut inhiber la formation de ces enzymes, et leur addition régénère le pouvoir producteur des germes en question.

Pour contrôler si la *Thiamine* avait une action stimulante spécifique pour l'*Hyaluronidase*, ROGERS a mis à l'épreuve la carence en *Amide*

nicotinique ; celle-ci a provoqué le même effet que la *déficience en Thiamine*. L'auteur conclut que chacun de ces facteurs de croissance freine sélectivement la production d'*Hyaluronidase* s'il n'existe qu'en dose insuffisante.

Gœtz a poursuivi ces travaux sur l'*Hyaluronidase* et il croit que la genèse de cette enzyme dépend de la présence d'*un métabolite qui est nécessaire pour la formation de Diphosphothiamine* ou, en ce qui concerne le *Nicotinamide*, *de Diphosphopyridine-nucléotide* (*Codéhydrase* I) ou de *Triphosphopyridine-nucléotide* (*Codéhydrase* II).

Nous avons pensé qu'il pourrait en être de même pour les autres vitamines jouant un rôle de *coenzyme* comme par exemple la *phosphopantothéine*, *préstade de la coenzyme A*. Ces corps, qui sont nécessaires pour régulariser le métabolisme enzymatique, sont très probablement aussi indispensables à la croissance et principalement à la formation des protéines des microorganismes en étude.

C'est pour cette raison que nous avons complété nos expériences en employant le milieu *Brain Heart Infusion Difco*, *appauvri par une culture préalable*. Nous avons complété 9 cc de cet ultracentrifugat avec une solution constituée par :

Mélange de 18 acides aminés ..... 1 cc,
Chlorure de sodium ..... 0,2 g,
Phosphate disodique ..... 0,2 g

Les Acides aminés étaient les suivants : Glycocolle, Alanine, Leucine, Isoleucine, Proline, Oxyproline, Lysine, Histidine, Acide glutamique, Acide aspartique, Tryptophane, Thréonine, Méthionine, Valine, Sérine, Cystine, Cystéine et Phénylalanine.

Ces Acides aminés ont été mis en évidence dans le *Brain Heart Infusion par chromatographie.*

Ce milieu stérilisé par ultrafiltration et ensemencé avec nos deux souches de *Streptocoques*, a permis la production de la *Streptokinase* à un taux plus élevé que le milieu original, puisque nous avons trouvé en moyenne 100 U/cc.

Cette constatation nous a montré que nous étions sur la bonne voie, nous avons par conséquent poursuivi cette expérience en supprimant l'addition des Acides aminés et en introduisant dans les 9 cc de notre milieu appauvri soit un mélange de :

Chlorure de sodium ..... 0,05 g
Phosphate disodique ..... 0,05 g

soit 0,2 g de Chlorure de sodium seul, ou 0,2 g de Phosphate disodique seul. Ces différents milieux de base ont été complétés avec la *Thiamine* (5 γ/cc), le *Nicotinamide* (10 γ/cc) ou le *Pantothénate de calcium* (5 γ/cc). Nous donnons dans les tableaux suivants les résultats de ces essais.

TABLEAU N° 7

Thiamine +	Streptokinase U/cc					
	Tubes N°				Témoins	
	1	2	3	4	5	6
	Streptocoque H 64					
A. C. P.	120	120	115	120	60	70
C + P	120	110	115	130	65	60
C	65	65	60	55	65	60
P	110	100	120	125	70	70
	Streptocoque H 46a					
A. C. P.	100	110	125	125	65	65
C + P	110	90	120	120	70	65
C	65	70	55	55	70	70
P	100	120	115	115	75	65

* Légende :

A = Acides aminés, C = Chlorure de sodium, P = Phosphate disodique.

TABLEAU N° 8

Nicotinamide +	Streptokinase U/cc					
	Tubes N°				Témoins	
	1	2	3	4	5	6
	Streptocoque H 64					
A. C. P.	75	70	75	65	70	65
C + P	65	60	65	75	70	70
C	35	0	30	20	65	60
P	60	75	60	70	70	60
	Streptocoque H 46a					
A. C. P.	60	55	65	60	70	60
C + P	50	55	60	65	65	60
C	20	25	0	0	65	60
P	75	50	50	50	60	65

TABLEAU N° 9

Pantothénate de calcium +	Streptokinase U/cc					
	Tubes N°				Témoins	
	1	2	3	4	5	6
	Streptocoque H 64					
A. C. P.	110	140	120	140	70	60
C + P	110	105	120	100	65	65
C	65	60	50	70	65	60
P	110	120	125	125	75	60
	Streptocoque H 46a					
A. C. P.	130	110	125	120	60	65
C + P	125	125	110	120	65	70
C	75	65	60	60	75	65
P	110	125	130	135	70	65

Interprétation :

En considérant ces résultats, on voit que nos deux souches de *Streptocoques* ont besoin, pour la production de *Streptokinase*, d'*ions phosphatés* que nous avons introduits dans le milieu sous forme de *Phosphate disodique*. Ce fait ressort des trois séries d'expériences. On constate d'autre part que l'addition des Acides aminés (milieu A C P) ne doit pas jouer un rôle essentiel dans la production des *Streptokinases*, puisque les résultats de la série A C P et de la série ne contenant que le *Phosphate seul* (P) sont sensiblement identiques. *Les Chlorures* (milieu C) n'ont aucune influence sur la production de l'enzyme.

Il semble se dégager des résultats du tableau N° 8 que le *Nicotinamide* ne joue aucun rôle dans la synthèse des *Streptokinases*, ou alors les *Streptocoques* sont aptes à élaborer à partir du substrat nutritif la quantité de *Vitamine PP* qui leur est nécessaire.

Il en est tout autrement pour la *Thiamine et l'Acide pantothénique*, où nous voyons que l'apport supplémentaire de ces deux vitamines stimule fortement le rendement en *Streptokinase*, à condition que les *Streptocoques* aient à leur disposition les *ions phosphatés nécessaires*, d'où il semble ressortir que les *Streptocoques* sont déficients en *Vitamines* B_1 et B_5 naturelles.

Tous ces essais ont été faits comparativement à deux tubes témoins contenant le milieu *Brain Heart Infusion Difco sans addition de vitamine*.

Après avoir fait ces constatations, nous en avons tenu compte pour la préparation et la purification de la *Streptokinase* que nous allons envisager dans le chapitre suivant.

CHAPITRE VI

PRÉPARATION ET PURIFICATION DE LA STREPTOKINASE

Par intérêt scientifique pur, nous avons essayé d'isoler une *Streptokinase* à partir de *nos propres cultures bactériennes* et de la purifier. Cette purification a été effectuée d'après différentes techniques décrites dans la littérature compétente, bien que nous ayons eu à notre disposition des moyens beaucoup moins développés que ceux mis en œuvre par les *auteurs américains.*

Pour toutes ces recherches, nous avons employé le *Bacto Brain Heart Infusion Difco*, dans lequel nous avons ajouté le *Pantothénate de calcium et la Thiamine ainsi que du Phosphate disodique* aux doses déterminées antérieurement.

Comme germe, nous avons employé la souche de *Streptocoque, Groupe C* N° H 64; nous tenons à faire remarquer que la *souche* N° H 46a avait un pouvoir de production de *Streptokinase* plus élevé, mais comme nous avons pu le démontrer antérieurement, la *souche* H 64 produit une *Streptokinase beaucoup plus stable*, ce qui semblait justifier notre choix, étant donné les manipulations plus ou moins compliquées et longues que demande la *purification de la Streptokinase.*

Nous avons cultivé *nos Streptocoques* dans des ballons de 250 cc à large ouverture contenant le *Brain Heart Infusion Difco* stérile. Nous avons d'autre part préparé les solutions des *Vitamines et de Phosphate disodique*, qui ont été stérilisées par ultrafiltration et introduites aseptiquement dans les ballons avant l'ensemencement qui est pratiqué à l'aide du *Streptocoque groupe C* N° H 64. Les bactéries ont été cultivées dans ce milieu pauvre en glucose, pendant 12 heures à 37°. A ce moment, on constate un développement satisfaisant et l'on introduit une solution-mère de Glucose pour ramener le taux à 5 %.

Après les premières douze heures de culture, le pH s'était ajusté à 7,1 mais l'introduction du glucose en fortes proportions amène une production d'Acide lactique très intense et il devient nécessaire d'ajuster de temps en temps le pH entre 7,0 et 7,5 par addition de NaOH 5N, ceci pour entretenir la croissance des bactéries et *pour éviter la diminution de la production de Streptokinase et même la destruction de la Streptokinase préformée.*

La culture est interrompue après 20 heures pour éviter une concentration trop élevée en *Lactate de sodium*, facteur inhibiteur de la croissance bactérienne et de la production de *Streptokinase.*

Le dosage que nous avons effectué à ce moment, montrait régulièrement un taux de 70 à 75 U/cc de *Streptokinase.*

D'après les données de MILSTONE, les bactéries devraient être séparées du bouillon de culture par une centrifugation à grande vitesse. Comme nous n'avions pas un tel centrifugeur à notre disposition, nous avons porté les cultures dans un mélange refroidissant : glace concassée + Chlorure de sodium qui donne une température de — 5°. Le liquide est ensuite centrifugé dans un centrifugeur ordinaire (6 000 t/mn) préalablement refroidi. On décante le liquide limpide surnageant qu'on filtre dans un dispositif refroidi à travers un filtre d'Iéna G 5 pour éliminer les bactéries vivantes. L'ultrafiltrat limpide est ensuite ajusté à un pH de 4,0 au moyen d'Acide acétique normal; la solution acide est refroidie à — 5° et on y introduit de l'Alcool éthylique préalablement refroidi jusqu'à une concentration finale de 45 %. Le mélange hydro-alcoolique est disposé à la glacière et il se forme après quelques heures un précipité relativement marqué de teinte blanchâtre.

Purification de la Streptokinase brute d'après le procédé de Christensen :

A ce sujet, il faut préparer les réactifs suivants :

Solution de Protamine à 1 % :

Nous avons employé la *Protamine Roche* conditionnée en ampoules de 1 % ou 5 %. Les Protamines sont des protéides simples dont la molécule est composée d'un nombre relativement restreint d'Acides aminés, parmi lesquels l'Arginine est prédominante. Elles sont principalement préparées à partir de testicules de saumon.

Solutions tampon :

Tampon au Véronal + Acide chlorhydrique de pH = 8,0;
Tampon à l'Acétate de sodium de pH = 4,2.

Pour la purification, on emploie le *précipité de Streptokinase brute* que l'on a séparé par centrifugation; on le lave à l'eau distillée, on centrifuge et on remet en solution dans la solution tampon au Véronal de pH 8,0. On dispose le mélange à la glacière en agitant de temps en temps. Cette solution renferme, à côté de la *Streptokinase et de la Streptodornase*, une certaine quantité d'impuretés. Pour les séparer on dilue cette solution au moyen du tampon au Véronal jusqu'à ce que son taux en *Streptokinase brute* soit encore d'environ 3 %. On centrifuge à froid pour éliminer toutes les impuretés non dissoutes.

On décante et la solution limpide est ramenée à 50 cc au moyen d'eau distillée. On ajuste le pH à 4,2 puis on ajoute 8 cc de la solution aqueuse de Protamine à 1 %, qui précipite toutes les protéines étrangères. Après centrifugation on recueille le liquide limpide, on ramène le pH à 5,6 pour

obtenir un précipité blanc, volumineux, se formant instantanément et qu'on récolte par nouvelle centrifugation à basse température.

Le liquide limpide décanté peut encore être traité par 1 cc de solution de *Protamine* pour récolter éventuellement les dernières traces de *Streptokinase*. A ce sujet, on dispose pendant 5 heures à la glacière, on centrifuge si c'est nécessaire et on sépare la solution limpide qui contient la *Streptokinase*. On réunit les deux solutions centrifugées que l'on refroidit à 0°, on introduit de l'Alcool refroidi à — 8° jusqu'à une concentration finale de 20 %. On place le mélange pendant 10 à 12 heures à la glacière dans un mélange de glace concassée + Chlorure de sodium. Il se forme un précipité blanc et fin, que nous avons essayé de récolter par centrifugation dans le centrifugeur refroidi. Ce précipité contient la *Streptokinase et la Streptodornase.*

Nous n'avons pas tenté de séparer ces deux enzymes, *puisqu'on les emploie toujours associées en clinique* et pour éviter encore des pertes en enzyme active. Nous avons déshydraté définitivement notre poudre enzymatique au moyen du vide sous Anhydride phosphorique.

Christensen indique un rendement de 25 % environ de *Streptokinase purifiée*. Dans ces conditions, nous aurions dû obtenir une *Streptokinase* titrant entre 15 000 et 18 000 U/litre, mais en réalité notre *Streptokinase purifiée* ne présentait que 10 % de l'activité du produit brut. Malgré ce rendement peu favorable, ce résultat nous semble satisfaisant et il prouve qu'on peut préparer une *Streptokinase purifiée* avec des moyens assez précaires, à condition de sauvegarder toutes les mesures évitant des pertes par adsorption ou destruction.

A ce sujet, il faut retenir les faits suivants :

Les manipulations d'isolement et de purification doivent être effectuées aussi rapidement que possible; les solutions ne doivent être conservées que dans les cas où c'est nécessaire pour l'intensification de la précipitation; il faut toujours travailler à un froid suffisant, de préférence à environ — 5°.

Tous les réactifs doivent être préalablement refroidis, ainsi que tous les récipients et le centrifugeur. Il faut éviter la filtration et avoir recours autant que possible à la centrifugation. En cas de nécessité on peut avoir recours au *filtre d'Iéna*, en travaillant avec le vide et au froid.

La préparation de la *Streptokinase pure* ne doit de toute façon pas dépasser quatre jours.

Purification de la Streptokinase brute d'après les procédés de Fletcher et Johnson :

Les réactifs nécessaires sont:

Le tampon à l'Acétate de pH = 4,2 et une solution de 0,25 mol. de sel disodique de l'Acide diéthylène-diamine-tétra-acétique *(Complexon III)*.

On prépare une solution à 3 % de *Streptokinase brute* après précipitation par l'Alcool dans une solution aqueuse de *Complexon III*. On centrifuge et on décante ; le liquide limpide est additionné de 20 cc d'Éther sulfurique refroidi et le mélange est disposé dans un système de glace concassée et d'Alcool, permettant de le congeler rapidement. Après deux heures environ, on décongèle lentement et on sépare la phase éthérée de la phase aqueuse au moyen d'une ampoule à agitation refroidie. La phase aqueuse est encore centrifugée pour éliminer toute trace d'impureté non soluble et le centrifugat est ajusté à pH 5,3 au moyen du tampon à l'Acétate.

On précipite la *Streptokinase* au moyen d'Alcool méthylique refroidi additionné jusqu'à une concentration finale de 12,5 %. Le précipité que nous avons ainsi obtenu était beaucoup plus volumineux que celui préparé par la méthode de Christensen à l'aide de la *Protamine*.

Le *précipité streptokinasique* est repris au moyen d'une solution tampon boratée de pH = 8,0 et cette solution est employée pour le contrôle de l'activité. Malgré le volume important du premier précipité, l'activité du produit purifié ne se montait qu'à environ 5% de celle du produit brut. Cette *Streptokinase* doit donc être très impure et les pertes *en enzyme active* subies par ce procédé de purification sont beaucoup plus élevées que par le procédé de Christensen. C'est pour cette raison que nous avons eu recours à *une deuxième méthode de purification*, due également à Fletcher et Johnson.

Les réactifs nécessaires sont :

— une solution aqueuse de 0,5 mol. du sel disodique de l'Acide diéthylène-diamine-tétra-acétique.

— Une solution à 0,02 mol. de Phosphate disodique.
— Une solution de NaOH et une solution de HCl N /10.
— Cellite lavée, employée comme réactif adsorbant.
— Une solution tampon boratée de pH = 8,0.
— Une solution saturée de Sulfate d'ammonium.
— Une solution à 0,2 mol. d'Acétate de sodium.
— Une suspension de Phosphate tricalcique.

Cette dernière est préparée de la façon suivante : Dissoudre 15,8 g de Phosphate trisodique dans 100 cc d'eau; d'autre part, dissoudre 6,66 g de Chlorure de calcium dans 100 cc d'eau distillée; mélanger les deux solutions. On obtient tout d'abord un précipité fin blanc qui se transforme ensuite, par l'ajustement à pH 7,0 en un gel épais de Phosphate tricalcique. On le reprend avec de l'eau distillée en quantité suffisante pour pouvoir centrifuger la suspension. Le liquide surnageant est rejeté et on procède ainsi à plusieurs lavages jusqu'à ce que l'eau de lavage soit exempte de Chlorure de sodium. Le culot de centrifugation final est remis en suspension dans 100 cc d'eau.

On prépare une solution de *Streptokinase brute* contenant environ 0,5 % d'enzyme que l'on introduit dans une partie de la solution de *Complexon III* et 16 parties de solution de Phosphate disodique. On ajuste le pH à 9,0 au moyen de NaOH N/10, puis on agite soigneusement jusqu'à dissolution complète. On introduit alors environ 2 g de Cellite lavée et on mélange fréquemment pour adsorber les impuretés. On centrifuge pour éliminer la Cellite. Le centrifugat décanté est additionné de 10 g environ de suspension de Phosphate tricalcique et le tout est agité mécaniquement pendant une heure, au froid. On centrifuge pour éliminer le gel et le centrifugat est additionné d'une solution saturée de Sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration finale de 30 %. On dispose à la glacière pendant environ 4 heures. Il se forme un précipité insignifiant qui, d'après les auteurs, doit être constitué par les protéines étrangères et que l'on élimine par adsorption sur la Cellite.

Le nouveau centrifugat est additionné d'une solution saturée de Sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration finale de 42 %. A ce stade la *Streptokinase* doit précipiter; cette réaction s'effectue après 24 heures de séjour à la glacière pour nos expériences et nous avons constaté la formation d'un précipité très flou, se déposant en laissant une solution surnageante limpide. Après centrifugation, nous avons repris le précipité dans 10 cc de solution tampon boratée à pH 8,0; mais lors du dosage de cette solution, l'activité streptokinasique ne dépassait pas 100 U/cc, ce qui représente un rendement d'à peine 1 % de l'activité du produit brut.

Nous avons répété une seconde fois cette purification, en employant de plus grandes quantités de filtrats culturaux. Par intérêt scientifique, nous avons modifié la technique en traitant le précipité obtenu par le Sulfate d'ammonium à 42 % au moyen de 15 cc d'Éther refroidi à — 5° additionné progressivement au cours d'une demi-heure. Puis nous avons centrifugé à — 5°; la phase aqueuse est encore épuisée par l'Éther. Le nouveau centrifugat est repris avec de l'eau saturée d'Éther et contenant une trace d'Acétate de sodium. La nouvelle solution est ajustée à pH = 6,2 et additionnée d'une quantité d'Acétate de zinc jusqu'à la concentration finale de 0,01 mol.

Nous étions parti d'un substrat enzymatique présentant une activité de 35 000 U litre et le précipité final récolté ne présentait qu'une activité atteignant à peine 1 % de celle du produit brut.

Discussion :

A la suite de ces résultats, *nous croyons pouvoir formuler les arguments suivants* au sujet de la technique de Fletcher et Johnson :

On emploie fréquemment des adsorbants et il nous semble douteux qu'ils adsorbent spécifiquement les impuretés et cèdent à la phase aqueuse la *Streptokinase totale et non modifiée.*

La précipitation des substances protéiques au moyen de sels neutres à différentes concentrations n'est notoirement pas toujours spécifique.

La précipitation finale au moyen de Sulfate d'ammonium et d'Acétate de zinc demande un temps relativement long au cours duquel une certaine partie de *Streptokinase* est certainement détruite.

Les solutions contenant le Sulfate d'ammonium aux concentrations indiquées par les auteurs ne peuvent pas être disposées à des températures inférieures à 0° pour éviter la précipitation du Sulfate d'ammonium par le froid. La concentration en sel neutre nécessaire ne serait donc plus sauvegardée.

En résumé, nous croyons pouvoir conclure que l'*isolement et la purification de la Streptokinase* dans un laboratoire moyennement outillé sont réalisables le plus aisément à l'aide *de la méthode de* CHRISTENSEN *à la Protamine*. Le protocole en est relativement simple, les manipulations ne sont pas trop compliquées et le rendement est supérieur à celui des deux autres méthodes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le but de notre travail était de résoudre principalement quatre problèmes :

1° L'étude de la *genèse de Streptokinase par des Streptocoques*. Nous avons finalement pu sélectionner 5 souches de Streptocoques β-hémolytiques dont trois du groupe A et deux du groupe C.

2° L'étude de la *thermostabilité des Streptokinases* formées.

3° La détermination de *différents activateurs* jouant dans la production quantitative de *Streptokinase*.

4° *L'isolement et la purification des Streptokinases* élaborées par nos souches streptococciques.

Nous avons tout d'abord jugé nécessaire de donner les bases théoriques expliquant le *processus de fibrinolyse ;* nous avons donc été obligé de considérer en premier lieu la *réaction de coagulation, puis les facteurs intervenant dans la fibrinolyse.*

Le rôle de la *Streptokinase* dans le processus de fibrinolyse a été envisagé en détails, puisque depuis la découverte du mécanisme d'action de la *Streptokinase* par TILLET et GARNER en 1934, celui-ci a souvent prêté à discussion et ce problème n'est toujours pas définitivement résolu. En principe, on peut admettre que la *Streptokinase* ne possède pas d'activité fibrinolytique propre; elle agit comme *kinase sur un proactivateur*. Ce dernier semble être constitué par un *Anticorps spécifique thermostable et une fraction du complément (probablement le chaînon* C'_1*) facteur thermolabile*. La *Streptokinase* convertit ce proactivateur en sa forme active pour former la *Profibrinolysine* qui à son tour est transformée *en Fibrinolysine*, enzyme protéolytique apte à dissoudre *la Fibrine.*

Dans l'organisme humain il existe un système fibrinolytique qui est équilibré normalement par des activateurs et des inhibiteurs. *Le processus de fibrinolyse* n'étant toujours pas résolu, nous croyons que le schéma de R. GROSS et B. RAHN tient le mieux compte des connaissances actuelles sur ce mécanisme.

Nous avons ensuite rapporté nos connaissances sur la *Streptokinase* et très succinctement celles sur les *Antistreptokinases*. Nous donnons les détails sur l'origine, la préparation et l'emploi thérapeutique des *Streptokinases.*

Cette enzyme est employée depuis quelques années en combinaison avec la *Streptodornase* pour fluidifier des exsudats fibrineux et purulents. Le problème le plus délicat, mais récemment résolu, est celui de l'emploi de la *Streptokinase* en injection intraveineuse pour la fluidification des *thrombus intravasculaires*. Cette question a été difficile à résoudre, puisqu'on sait que la *Streptokinase* a une action nuisible sur le Complément et la Prothrombine. D'autre part, la purification de ces enzymes est très difficile et les impuretés protéiques occasionnent facilement des *réactions allergiques secondaires*.

En ce qui concerne nos travaux personnels, nous avons tout d'abord étudié l'influence de doses progressivement croissantes de *Streptokinase sur un système de coagulation fibrineux artificiel*. Ce substrat réactionnel connu nous a permis le dosage des *Streptokinases* dans les filtrats de *culture streptococcique au moyen du Thrombographe de* Hirtz. Nous avons constaté qu'il existe un rapport quantitatif entre les *doses de Streptokinase* introduites dans le substrat réactionnel et l'évolution des tracés thrombographiques. Nous avons ainsi pu établir une *courbe standard* qui nous a permis de déterminer la *dose de Streptokinase* par rapport au temps de lyse de notre système de coagulation artificiel.

Nous avons sélectionné de cette manière *cinq souches de Streptocoques producteurs satisfaisants de Streptokinase*. Ces souches ont été cultivées dans le milieu spécial *Brain Heart Infusion Difco* à 37° ; le taux de *Streptokinase* apparaissant dans le filtrat de culture a été déterminé après 12, 16, 20, 24 et 48 heures de culture.

Deux de nos souches β-hémolytiques du groupe C *de Lancefield* étaient d'excellents producteurs de *Streptokinase*. Parmi les trois souches β-hémolytiques *du groupe A*, le *Streptocoque* 9994 était le moins bon producteur. Nous avons constaté que *des cultures de* 20 *heures* donnaient le meilleur rendement en *Streptokinase* et nous n'avons jamais pu noter une diminution du *taux de Streptokinase* au cours de ces premières 20 heures de culture.

Notre intérêt s'est ensuite porté sur l'étude des *caractères physiques de nos Streptokinases*. Nous avons tout d'abord contrôlé l'*influence de la température sur la production et sur la stabilité de la Streptokinase*. A ce sujet, nous avons placé les *filtrats streptokinasiques* à la glacière, à la température du laboratoire et à 37°. Le *taux de Streptokinase* a été dosé après 6, 24, 48 et 72 heures de séjour à ces différentes températures.

Il résulte de ces expériences que des *solutions diluées de Streptokinase* de 40 à 80 U/cc ne peuvent être conservées qu'à la glacière et ne sont stables dans ces conditions que pendant 24 heures.

Nous avons ensuite étudié l'*influence de facteurs activant éventuellement la production de Streptokinase*. En nous référant aux travaux de Rogers et de Gœtz, nous avons éprouvé des Vitamines, telles que la *Thiamine*, le *Nicotinamide*, le *Pantothénate de calcium* et l'*Acide ascorbique*, et comme métabolite ionique, le Chlorure de sodium et le Phosphate disodique.

Nos premières expériences ont été effectuées avec des concentrations relativement faibles en Vitamines et ont donné des résultats négatifs. Nous avons envisagé trois possibilités à ce sujet :

— la concentration en Vitamine ajoutée pouvait être trop faible;

— le milieu *Brain Heart Infusion* pouvait contenir des quantités optimales de Vitamines ;

— *les Streptocoques pouvaient élaborer des Streptokinases* sans avoir besoin de Vitamines.

Pour élucider ce problème nous avons fait de nouvelles séries d'expérience en employant des doses de Vitamines 100 fois plus fortes. Les résultats ont encore été négatifs et le seul fait concret semble être que l'*Acide ascorbique* à forte dose freine plutôt la production de *Streptokinase.*

Nos expériences avec un milieu appauvri et additionné de 18 Acides aminés spécialement sélectionnés, de Chlorure de sodium et de Phosphate disodique ont prouvé que les *Streptocoques ont besoin d'ions phosphatés pour la production de la Streptokinase.* Il s'en dégage également que l'addition d'*Acides aminés* ne joue pas un rôle essentiel et que les *Chlorures* n'ont aucune influence sur la production de l'enzyme.

Il en est de même pour le *Nicotinamide ;* par contre, la *Thiamine* et l'*Acide pantothénique*, introduits à faible dose dans le milieu appauvri stimulent fortement le rendement en *Streptokinase*, à condition que les *Streptocoques* aient à leur disposition les ions phosphatés nécessaires pour pouvoir synthétiser les dérivés énergétiques intervenant dans le métabolisme enzymatique des germes.

Finalement, nous avons essayé d'*isoler et de purifier une Streptokinase* provenant de notre souche de *Streptocoque β-hémolytique* H 64 et qui s'était montrée très stable vis-à-vis des influences physico-chimiques. Nous avons mis en œuvre le procédé de purification de Christensen employant la *Protamine* comme substance de purification principale et deux techniques de Fletcher et Johnson qui ont recours à des adsorbants et des précipitations au moyen de sels neutres. Ces deux dernières méthodes ne nous ont pas donné satisfaction, alors que celle de Christensen a donné un rendement en *Streptokinase purifiée* représentant une activité de 10 % du produit brut initial. Nous avons constaté que le protocole expérimental de cette méthode est relativement simple et utilisable dans des laboratoires moyennement outillés. La réussite de cette purification dépend de la rapidité des manipulations, qui doivent être effectuées à des températures entre 0° et — 5°, en évitant la filtration. Il faut autant que possible éviter des techniques employant des adsorbants et des méthodes de précipitation par des sels neutres.

Tous nos dosages de l'activité de la Streptokinase brute ou purifiée ont été possibles grâce à l'emploi du Thrombographe de Hirtz et du système de coagulation artificiel à la fibrine élaboré par Frey et que nous avons légèrement modifié pour les besoins de notre travail.

Grâce à nos méthodes *de dosage au moyen du Thrombographe et de purification de la Streptokinase*, il sera possible de régulariser le potentiel fibrinolytique du sang circulant et de poursuivre un traitement de *Streptokinase* par perfusion intraveineuse jusqu'à ce que toute ou presque toute la Profibrinolysine soit transformée en protéase active: *Fibrinolysine*. Ce traitement peut occasionner une diminution du pouvoir protéolytique du *Fibrinogène sérique et des autres facteurs plasmatiques de la coagulation*. Ces inconvénients relevés lors de l'expérimentation sur les animaux ne se sont pas manifestés *en clinique*, de sorte qu'avec des *Streptokinases purifiées et le contrôle thrombographique*, il nous semble actuellement possible de lyser des *thrombus « in situ »*. Gross et ses collaborateurs ont confirmé ces faits sans jamais observer de réactions secondaires importantes.

D'autre part, il ressort de *notre schéma de fibrinolyse* que nous avons aujourd'hui suffisamment de *médicaments antidotes*, permettant de régler rapidement les effets fibrinolytiques trop prononcés et dus à l'emploi de la *Streptokinase*. Ces antidotes bien supportés sont : l'*acide ε-aminocapronique*, *quelques Acides aminés à structure voisine*, *les inhibiteurs extraits du pancréas et de la fève de soja*. Tous ces produits peuvent être employés avec succès contre des *fibrinolyses spontanées ou provoquées*. L'acide ε-aminocapronique agit surtout sur l'activateur de la Profibrinolysine et probablement aussi sur la *Fibrinolysine*. Les inhibiteurs de soja et de pancréas freinent l'action de la *Trypsine*, *de la Fibrinolysine* et des autres enzymes protéolytiques. Les extraits pancréatiques et l'Acide ε-aminocapronique troublent moins la coagulation sanguine que les inhibiteurs de soja et sont de ce fait préférables en clinique. L'Acide ε-aminocapronique qui a une structure chimique très voisine de la *Lysine* est particulièrement bien tolérée en administration intraveineuse et buccale (jusqu'à 30 g par ingestion et par jour). La clinique possède par conséquent en la Streptokinase un médicament suffisamment actif pour lyser les *thrombus « in situ »* et qui ne présente pas plus de danger que les *anticoagulants* habituellement employés au point de vue prophylaxie ou thérapeutique.

Nous voyons ainsi que, grâce à l'emploi de *Streptokinase purifiée et à des méthodes de contrôle* applicables à tout moment, le traitement des troubles de la coagulation a fait un grand progrès.

BIBLIOGRAPHIE

(9) Alexander. — Journ. clin. Invest., 1950, 29, 881.

(5) Arthus et Pagès. — Arch. Physiol. norm. et path., 1890, 82, 739.

(21) Astrup et Permin. — Acta physiol. scand., 1948, 16, suppl. 53, 4.

(20) Burstein. — *La coagulation du sang*, Masson, Paris, 1949.

(32) Mac Carty. — Journ. exp. Med., 1948, 88, 181.

(3) Christensen L. R. — Journ. gen. Physiol., 1945, 28, 336.

(31) Christensen L. R. — Journ. of clin. Invest., 1949, 28, 163.

(17) Christensen L. R. et Mac Lean. — Journ. gen. Physiol., 1945, 28, 559.

(16) Dastre A. — Arch. physiol. norm. et path., 1893, 5, 661.

(15) Feissly R. — Journ. suisse de Médecine, 1959, 40, 1034.

(18) Ferguson. — Fet. Proced., 1949, 2, 44.

(30) Fletcher et Johnson. — Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1957, 94, 233.

(28) Frey W. — *Streptokinase et Antistreptokinase.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1959.

(1) Garner et Tillet. — Journ. exp. Med., 1934, 60, 239.

(4) Geiger W. B. — Journ. Immunol., 1952, 69, 597.

(36) Goetz K. — *Les Hyaluronidases chez les champignons inférieurs pathogènes. Leurs activateurs et inhibiteurs.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg 1960.

(24) Grob. — Journ. gen. Physiol., 1943, 26, 405.

(33) Gross et collab. — Deutsch. Med. Woch., 1960, 2 déc. N° 49, p. 2129.

(26) Halse. — Arch. Intern. Pharm., 1951, 86, 168; *Monographie: Fibrinolyse*, Karcher, Bâle, 1953.

(12) Jurgens, Beller et Gänsslen. — *Klin. Methoden der Blutgerinnungsanalyse*, Stuttgart 1959.

(25) Kaulla (von). — Journ. Lab. and Clin. Med. Amer., 1956, 48, 952.

(23) Kline et Fishman. — Ann. N. Y. Ac. Sc., 1957, 68, 25.

(10) Koller F. — Arch. exp. Path. Pharmak., 1954, 232, 89.

(11) Koller F., Loeliger A. et Duckert F. — Rev. Hémat. Paris, 1952, 7, 156.

(19) Loomis, Ryder et George. — Arch. Biochem., 1949, 20, 444.

(13) Marbet et Winterstein. — Experientia, Bâle, 1954, X, 7, 273; Deutsche Med. Woch. 1954, 25, 877.

(2) Milstone H. — Journ. of Immunol., 1941, 42, 109.

(6) Morawitz P. — Erg. Physiol., 1905, 4, 309

(27) Nolf. — Arch. Intern. Pharm., 1945, 71, 1; Arch. Intern. Physiol., 1948, 56, 111.

(35) Ochsner P. — *L'Antihyaluronidase sérique dans différentes maladies humaines.* Thèse Doct. Pharm Strasbourg 1958.

(14) Ostrom Y. — *Rôle de l'acide pantothénique dans la formation de la Prothrombine et des facteurs de coagulation du sang de lapin.* Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1960.

(8) Owren P. — Acta med. scand., 1947, 194, 1, suppl.

(7) Quick A. J. — Amer. Journ. Physiol., 1935, 114, 282.

(36) Rogers. — Journ. gen. Microbiol., 1957, 16, 22-27.

(29) Seegers et Johnson. — Techniques in blood coagulation used at Wayne University, Detroit, 1953.

(22) Tagnon. — Journ. Lab. and clin. Med., 1942, 9, 1119.

(34) Tillet W. S. — Journ. of clin. Invest. 1955, 34, 169.

Vu, Strasbourg, le 25 février 1961

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 27 février 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

P. DUQUÉNOIS

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 2 mars 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 7

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Généralités sur la coagulation et la Fibrinolyse 9

CHAPITRE II

Généralités sur la Streptokinase 17

Origine et propriétés 17
Essai de standardisation de la Streptokinase 17
Préparation de la Streptokinase 18
Isolement de la Streptokinase 19
Purification de la Streptokinase 19
La Streptodornase 21
Emploi thérapeutique de la combinaison Streptokinase-Streptodornase 21
Les Antistreptokinases 24

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

Dosage de la Streptokinase au moyen du thrombographe de Hirtz 27

CHAPITRE IV

Détermination de la production de Streptokinase de différentes souches de Streptocoques 35

Recherche du taux de Streptokinase dans les filtrats de culture 35
Contrôle de la stabilité de nos Streptokinases 38

CHAPITRE V

Influence de diverses vitamines et d'autres activateurs sur la production de Streptokinase 43

Protocole expérimental 45

Interprétation 50

CHAPITRE VI

Préparation et purification de la Streptokinase 51

Purification de la Streptokinase brute d'après le procédé de CHRISTENSEN .. 52

Purification de la Streptokinase brute d'après les procédés de FLETCHER et JOHNSON 53

Discussion 55

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 57

BIBLIOGRAPHIE 61

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES
DE STRASBOURG

*

Dépôt légal N° 1042/1961